

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平9-500614

(43)公表日 平成9年(1997)1月21日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I
C 0 7 K 19/00		8517-4H	C 0 7 K 19/00
A 6 1 K 39/00	ADY	9284-4C	A 6 1 K 39/00
C 0 7 K 14/155		8517-4H	C 0 7 K 14/155
			ADYH

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全116頁)

(21)出願番号 特願平6-525624
(86)(22)出願日 平成6年(1994)5月13日
(85)翻訳文提出日 平成7年(1995)11月14日
(86)国際出願番号 PCT/US94/05142
(87)国際公開番号 WO94/26785
(87)国際公開日 平成6年(1994)11月24日
(31)優先権主張番号 08/060,988
(32)優先日 1993年5月14日
(33)優先権主張国 米国 (US)
(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), AU, CA, JP

(71)出願人 アメリカ合衆国
アメリカ合衆国、メリーランド州 20852、
ロックビル、スイート 325、エグゼク
ティブ・ブールバード 6011、オフィス・
オブ・テクノロジー・トランスファー、ナ
ショナル・インスティテュート・オブ・ヘ
ルス
(72)発明者 バーゾフスキー、ジェイ・エー
アメリカ合衆国、メリーランド州 20814、
ベセスダ、コーシカ・ドライブ 9321
(74)代理人 弁理士 鈴江 武彦 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 HIVに対する中和性抗体および細胞障害性Tリンパ球を誘発する複合合成ペプチド構築物

(57)【要約】

四つの異なったハプロタイプのマウスにおける増殖応答、並びにHIV陽性で且つflu陽性の患者の52～73%でIL-2応答を誘導することが先に同定されている、HIVのエンベロープタンパクに由来する多重決定基Tヘルパーペプチド類を含んだペプチド構築物が、HIV-IIIBの主要中和性決定基に対応し、且つ優勢CTLエпитープを含むことが示されているHIV-1・gp160のV3ループ中のペプチド18と共に、共線形的(co-linearly)に合成された。当該ペプチドに含まれるT細胞エпитープに対して以前に応答したマウスの全株において、単一の免疫感作により、ペプチド18抗体のための同種の補助が誘発された。マウスの二つの株において達成された中和性抗体のレベルが、チンパンジーにおける同種ウイルスの攻撃から防御するために十分なレベルと比較された。一回の追加免疫の後、1:1000～1:16,000の範囲での90%中和のための著しく高い抗体力価が達成された。DクラスI・MHC分子を共有するが、異なったクラスII分子を有する、三つの異なったMHCハプロタイプのマウスから得た脾臓細胞を当該複

合ペプチドで免疫感作したところ、増大したgp160特異的なCTL活性を示した。

【特許請求の範囲】

1. 単離され精製されたポリペプチドであって、

a) ヘルパーT細胞応答を誘発できる標的抗原から誘導されたエピトープを有する第一のペプチドと；

b) 細胞障害性T細胞応答を誘発できるエピトープを有する第二のペプチドと；

c) 前記抗原に対する高力価の中和性抗体応答を誘発できるエピトープを有する第三のペプチドとを具備し、

夫々の応答が、広範な移植抗原ハプロタイプを提示する哺乳類種の複数の個体において生じ、更に、前記ペプチドの夫々が他の両方のペプチドに対して隣接して結合しているポリペプチド。

2. 請求項1に記載のポリペプチドであって、前記細胞障害性Tリンパ球エピトープおよび前記中和性抗体エピトープが、重なったアミノ酸配列内に含まれるポリペプチド。

3. 請求項1に記載のポリペプチドであって、前記ペプチドの夫々が、線形に直列に結合されているポリペプチド。

4. 請求項3に記載のポリペプチドであって、ヘルパーT細胞エピトープを有する前記第一のペプチドが、細胞障害性T細胞エピトープを有する前記第二のペプチドのアミノ末端に結合されており、該第二のペプチドは、中和性抗体エピトープを有する前記第三のペプチドのアミノ末端に結合されているポリペプチド。

5. 請求項3に記載のポリペプチドであって、ヘルパーT細胞エピトープを有する前記第一のペプチドが、中和性抗体

エピトープを有する前記第三のペプチドのアミノ末端に結合されており、該第三のペプチドは、細胞障害性T細胞エピトープを有する前記第二のペプチドに結合されているポリペプチド。

6. 請求項3に記載のポリペプチドであって、細胞障害性T細胞エピトープを有する前記第二のペプチドおよび中和性抗体エピトープを有する前記第三のペプチドが、単一のペプチドの重なったアミノ酸配列に由来して形成されたものであ

るポリペプチド。

7. 請求項6に記載のポリペプチドであって、ヘルパーT細胞エピトープを有する前記第一のペプチドが、重なったアミノ酸配列を有する前記ペプチドのアミノ末端に結合されているポリペプチド。

8. 請求項1に記載のポリペプチドであって、前記ペプチド類は、ペプチド結合により共有結合的に連結され、分枝構造を形成しているポリペプチド。

9. 免疫原であって、

a) ヘルパーT細胞応答を誘発できる標的抗原から誘導されたエピトープを有する第一のペプチドと；

b) 細胞障害性T細胞応答を誘発できるエピトープを有する第二のペプチドと；

c) 前記抗原に対する高力価の中和性抗体応答を誘発できるエピトープを有する第三のペプチドとを具備し、

夫々の応答が、広範な移植抗原ハプロタイプを提示する哺乳類種の複数の個体において生じ、更に、前記ペプチ

ドの夫々が非ペプチド結合によって共有結合的に結合されている免疫原。

10. 請求項1に記載のポリペプチドであって、ヘルパーT細胞エピトープを有する前記第一のペプチドがクラスターペプチドであるポリペプチド。

11. 請求項10に記載のポリペプチドであって、細胞障害性T細胞エピトープを有する前記第二のペプチドがウイルスのエンベロープタンパクに由来し、また中和性抗体エピトープを有する前記第三のペプチドがウイルスのエンベロープタンパクに由来するポリペプチド。

12. 請求項1に記載のポリペプチドであって、ヘルパーT細胞エピトープを有する前記第一のペプチドはクラスターペプチドであり、細胞障害性T細胞エピトープを有する前記第二のペプチドは、ウイルスの表面には位置しない該ウイルスタンパクに由来し、また中和性抗体エピトープを有する前記第三のペプチドはウイルスのエンベロープタンパクに由来するポリペプチド。

13. 請求項1に記載のポリペプチドであって、T細胞エピトープを有する前

記ペプチドはクラスターペプチドであり、また細胞障害性T細胞エピトープを有する前記第二のペプチドおよび中和性抗体エピトープを有する前記第三のペプチドはHIV-1のgp160に由来するポリペプチド。

14. 請求項1に記載のポリペプチドであって、ヘルパーT細胞エピトープを有する前記第一のペプチドはクラスターペプチドであり、また細胞障害性T細胞エピトープを有する

前記第二のペプチドおよび中和性抗体エピトープを有する前記第三のペプチドはHIV-1のgp160におけるV3ループに由来するポリペプチド。

15. 下記のポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチド。

EQMHEDIISLWDQSLKPCVKRIQRGPGRAFVTIGK,
 KQIINMWQEVGKAMYAPPISGQIRRIQRGPGRAFVTIGK,
 RDNWRSELYKYKVVKIEPLGVAPTRIQRGPGRAFVTIGK,
 AVAEGTDRVIEVVQGAYRAIRHIPRRIQGLERRIQRGPGRAFVTIGK,
 DRVIEVVQGAYRAIRHIPRRIQGLERRIQRGPGRAFVTIGK,
 DRVIEVVQGAYRAIRRIQRGPGRAFVTIGK,
 AQGAYRAIRHIPRRIQRGPGRAFVTIGK,
 EQMHEDIISLWDQSLKPCVKRIHIGPGRAFYTCKN,
 KQIINMWQEVGKAMYAPPISGQIRRIHIGPGRAFYTCKN,
 RDNWRSELYKYKVVKIEPLGVAPTRIHIHIGPGRAFYTCKN,
 AVAEGTDRVIEVVQGAYRAIRHIPRRIQGLERRIHIGPGRAFYTCKN,
 DRVIEVVQGAYRAIRHIPRRIQGLERRIHIGPGRAFYTCKN,
 DRVIEVVQGAYRAIRRIHIGPGRAFYTCKN, 及び
 AQGAYRAIRHIPRRIHIHIGPGRAFYTCKN.

16. 哺乳類の対象において、細胞障害性T細胞応答および高力化の中和性抗体応答を含んだ、抗原に対する広い免疫応答を誘発するための方法であって、前記対象に対して、請求項1に記載の少なくとも一つのポリペプチドを投与することを具備した方法。

17. 哺乳類の対象において、細胞障害性T細胞応答および高力化の中和性抗体応答を含んだ、抗原に対する広い免疫応答を誘発するための方法であって、前記対象に対して、請求項9に記載の少なくとも一つの免疫原を投与することを具

備した方法。

18. 請求項16に記載の方法であって、前記ポリペプチドが下記のポリペプチドからなる群から選択される方法。

EQMHEDIISLWDQSLKPCVKRIQRGPGRAFVTIGK,
 KQIINMWQEVGKAMYAPPISGQIRRIQRGPGRAFVTIGK,
 RDNWRSELYKYKVVKIEPLGVAPTRIQRGPGRAFVTIGK,
 AVAEGTDRVIEVVQGAYRAIRHIPRRIRQGLERRIQRGPGRAFVTIGK,
 DRVIEVVQGAYRAIRHIPRRIRQGLERRIQRGPGRAFVTIGK,
 D R V I E V V Q G A Y R A I R R I Q R G P G R A F V T I G K ,
 AQGAYRAIRHIPRRIRRIQRGPGRAFVTIGK,
 EQMHEDIISLWDQSLKPCVKRIHIGPGRAFYTTKN,
 KQIINMWQEVGKAMYAPPISGQIRRIHIGPGRAFYTTKN,
 RDNWRSELYKYKVVKIEPLGVAPTRIHIGPGRAFYTTKN,
 AVAEGTDRVIEVVQGAYRAIRHIPRRIRQGLERRIHIGPGRAFYTTKN,
 DRVIEVVQGAYRAIRHIPRRIRQGLERRIHIGPGRAFYTTKN,
 DRVIEVVQGAYRAIRRIHIGPGRAFYTTKN, **および**
 AQGAYRAIRHIPRRIRRIHIGPGRAFYTTKN.

19. 病原に対する露出を診断し、または免疫機能を評価するための方法であって、

i) 対象から得たサンプルを請求項1のポリペプチドに接触させる工程と;

ii) 前記ペプチドに対する免疫応答を測定する工程とを具備し、

前記免疫応答は、ヘルパーT細胞応答、細胞障害性T細胞応答および抗体力価からなる群から選択される方法。

20. 請求項19に記載の方法であって、前記の測定工程ii) は、インターロイキン-2の産生、T細胞増殖および抗体結合活性からなる群から選択される応答を試験することに

よって行われる方法。

【発明の詳細な説明】H I Vに対する中和性抗体および細胞障害性Tリンパ球
を誘発する複合合成ペプチド構築物**【関連出願】**

本件出願は、1992年3月6日に提出された同時継続のアメリカ合衆国出願第07/847,311号の一部継続出願であり、この親出願は、1988年1月26日に提出されたアメリカ合衆国出願第07/148,692号の一部継続出願である。また、本件出願は、1991年8月29日に提出された同時継続のアメリカ合衆国出願第07/751,998号の一部継続出願である。これら全ての出願は、全体として本件出願の一部をなすべく、参照として本明細書に組み込まれる。

【発明の背景】発明の分野

本発明は、共有結合的に結合したTヘルパー（T_h）エпитープ、細胞障害性リンパ球（CTL）エпитープ、および感染性物質（特に寄生性またはウイルス性の病原）に対して中和性抗体応答（A_bN）を誘発するエпитープを含んだペプチド類に関する。本発明の適用において特に焦点が当てられる例は、ヒト・免疫不全ウイルス（HIV）に対するものである。当該ペプチドは、広範な腫瘍組織適合性複合体（MHC）タイプを有する宿主において、これら三つの全ての応答を誘発する特徴を有している。

本発明はまた、上記ペプチドを利用した、HIVに感染した個体における免疫機能の測定法方に向けられている。本発明は更に、上記ペプチドをワクチン組成物の一成分として、または単一の活性成分として用いた予防ワクチンまたは治療ワクチンに向けられている。

関連技術の説明

自然感染の際に誘起されるHIV抗原に対する免疫応答は、ウイルス感染を規制(regulate)する反応と、免疫機能の一体性(integrity)に対して拮抗する反応との均衡かもしれない(1-3)。この均衡に対して有利または不利に影響する決定因子は、未だ定かではない。宿主の初期免疫応答は、免疫機能不全の増大を

伴う進行性の衰弱性疾患に至る持続的HIV感染の経過に影響するように思える(4-7)。該ウイルスは、抑制エピトープ(suppressive epitopes)またはマスク糖鎖(masking carbohydrate)のような、免疫系を回避できる構造、クローン制限(clonal restriction)を含む構造(8-10)、或いはウイルスの感染性を高める抗体(11-16)または免疫不全に寄与する自己抗体もしくはT細胞(17-20)のような構造を含んでいるかもしれない。

HIVエンベロープの主要な中和性決定基(PND)は、第三超可変領域またはシステイン残基301および331の間のV3ループに位置する(21-23)。V3ループに対するより広範な中和性抗体も見出されているが(27)、当初ペプチド結合ELISAで調べたときには、この領域の抗体はその中和特性においてタイプ特異的であり、より交差反

応性であることが示された(23-26)。合成ワクチンの開発にとっては幸運なことに、このような抗体は、短いペプチドでの免疫感作によって発生させることができる(21, 28, 29)。細胞フリーの同族ウイルスによる攻撃に対するV3特異的抗体の防御効率が、チンパンジーにおける抗原投与研究で示されている(15, 30, 31)。また、極く最近においては、V3ループに特異的なマウス/ヒトIgG1キメラモノクローナル抗体をチンパンジーに受動移入することによって、ウイルス攻撃に対する防御が達成された(32)。この領域の内および外(しかし影響はある)におけるウイルスエンベロープタンパクの配列変化は、中和回避突然変異体および可能なCTL免疫回避突然変異体の両者において生じ、細胞の向性を変化させる(33-37)。

感染個体において、HIV単離体における高度の遺伝子可変性がみられる(38-40)。所定の個体から単離されたHIVは、疾患の経過に亘って変化するように思える。免疫の圧力下では、ウイルスは感染の過程において、細胞変性(cytopathicity)、複製速度、および細胞向性のような発現型特性における相違を示すように見える。ウイルスが、感染の間に低レベルで連続的に複製し、また「真の潜伏」の状態を獲得しないことは、HIV-1が慢性の活性感染を達成し、また選択的な機構がウイルスの存続に重要な役割を果たすとの見解(33)を支

持する。当該エンベロープタンパクのPNDをコードする多くの異なったV3領域が、抹消血液単核細胞(PBMC)由来のHIV単離体中に検出されており、

このことは、陽性選別によってイン・ビボにおけるHIV・env遺伝子の著しい多様性が導かれることを示唆している(40)。にもかかわらず、PNDは、配列の多様な単離体によって生成される中和性抗体の標的となる保存されたエピトープを含んでおり、またPNDに由来する限定数のペプチド類が、たとえ力価が低く、おそらくは親和性が低くとも、多くの単離体を認識する中和性抗体を誘発できるとの証拠が存在する(24, 25, 41)。

有効なワクチンのための基準は、安全であること、即ち、自己免疫またはウイルス増大反応を誘起しないことだけでなく、感染ポピュレーションにおいて優越的な全ての可能なHIV変種に対して、細胞性免疫応答および中和性抗体応答を誘発できることでなければならない。加えて、所定の個体のMHC分子は、全体としての種(species)によって認識される可能な抗原性決定基のサブセットのみと結合してこれを認識するであろうから、合成ペプチドワクチンはまた、殆どのHLAタイプのT細胞による認識を誘発するために十分な抗原決定基を組み込んでいなければならない。

従って、我々は先の研究において、夫々がHIVエンベロープの6つの多重決定基Tヘルパー領域に対応する、20~33残基の6種類の合成ペプチドを構築した(42)。クラスターペプチドと呼ばれるこれらのペプチドは、3または4のハプロタイプのマウスのT細胞を増殖することによって認識される、重なってはいるが異なるTヘルパーエピトープに亘っている。これらのクラスターペプチドは、組換えgp1

60 (rgp160)で免疫感作されたマウス、並びにHIVに感染したヒトの抹消血液リンパ球において、T細胞応答を刺激する能力について試験された。マウスはまた、完全なgp160に応答したイン・ビトロでのT細胞の誘導について試験するために、当該クラスターペプチドで免疫感作された。クラスターペプチド3、4および6(表Iの配列を参照のこと)は、rgp160で免疫感作さ

れた、4つのMHCハプロタイプの全てのマウスに由来するT細胞を刺激した；また、マウスを当該クラスターペプチドで免疫感作すると、イン・ビトロで全エンペロープタンパクを認識することができるT細胞応答が誘発された。クラスターペプチド1は今回の研究においても用いられ、一つのマウス株でのみ強力に増殖を刺激した。これに対して、他の三つのマウス株は、当該ペプチドが作成された起源である多重決定基領域の成分を認識した。従って、全体は、その部分の総和よりも低い活性を有していた(42)。クラスターペプチド1、3、4および6は、HIV陽性でインフルエンザ陽性の抹消血液リンパ球において、夫々試験症例の64、73、52および58%で、顕著なIL-2応答を刺激した。多分、試験された患者は多数の異なったHIV副株に感染していたであろう事実にも拘わらず、このような高い応答が得られたことは注目に値する。クラスターペプチド1、3および4は、北アメリカおよびヨーロッパのHIV単離体の間で相対的に保存された配列を有しており、またクラスターペプチド6は、保存配列および可変配列の間の境界に亘って広がっていた(43)。

成功するペプチドワクチンは、多くのHLAタイプのワクチン被接種者において、中和性抗体応答と共に、Tヘルパー(T_h)および細胞障害性Tリンパ球(CTL)応答を誘発できなければならない。主要組織適合性複合体(MHC)クラスI制限CTL(MHC class I-restricted CTL)は、ウイルス感染からの回復において中心的な役割を果たすように思える(81)。イン・ビトロでは、外因性リンホカイン類はCTL前駆体の成熟におけるT細胞の補助(T-cell help)を肩代わりできるけれども、T_h-B細胞の共働と比較すると、イン・ビボでのCTLのプライミングにおけるT_hの役割は未だ少ししか理解されていない。CTL誘導におけるヘルパーの必要性については多くの証拠があるが(82-90)、補助(help)から独立したCTL誘導についての証拠も存在する(85, 91-95)。更に、今日までの研究では、B細胞に関する同族補助(cognate help)におけるハプテンへのキャリアの連結に類似した、CTL決定基へのヘルパー抗原性決定基の共有結合的連結を要求する補助の必要性は示されていない。この証拠の欠如は、CTLの標的が全細胞であり、最近まで、免疫感作には全細胞(組織移

植片) または生ウイルスが必要とされていたという事実に起因するのかもしれない。決定基連結の示唆に至り得る最も密接に関連した証拠は、拒絶反応を誘発するために、ヘルパー決定基およびCTL決定基は同じ皮膚移植片に存在しなければならないことを示すものであった。しかし、これを更に分子レベルにおいて発展させることはできなかった。今や、CTL誘発のためのペプ

チド免疫感作の可能性が示されており(96-100)、ヘルパーおよびCTLの両者の決定基を含むペプチドを用いて、この疑問の解明に取り組むのが容易になっている。最近の証拠は、ヘルパー部位が有益であることを示しているが(90, 101, 102)、ヘルパー部位およびCTL部位を結合する必要があるか否かは不明である。実際に、未結合のヘルパーおよびCTLエピトープペプチドは、二つの研究においては有効であり(90, 102)、他の研究においては試験されていない(101)。しかし、前者の研究においては、ヘルパーおよびCTL決定基ペプチドの混合物が、これら二つのペプチドを同じ微小環境に隔離する不完全フロイントアジュバントエマルジョン中に含有させた形での投与され、或いは多重免疫感作のための高投与量で与えられた。

[発明の概要]

本発明は、病原により発現される抗原に対して広範な免疫応答を与えるペプチドに向けられている。当該抗原は、典型的にはウイルス性または寄生性の病原に由来する抗原である。ペプチド設計のための我々の基本方針は、夫々のクラスターペプチドを、クラスI分子と共同してCD8細胞障害性T細胞により認識される免疫優勢部位であることが先に同定されており、またHIV-III BエンベロープタンパクのV3ループまたは主要中和性決定領域内に存在する短い合成ペプチド(ペプチド18)に連結することである。

広範なMHCタイプ(マウスのH-2遺伝子座、ヒトのH

LA遺伝子座と等価)を有する宿主を、本発明のペプチドで免疫感作することによって、液性および細胞性の両方の成分を有する免疫応答がもたらされる。液性サイドでは、高力化の中和性抗体応答が観察される。細胞性免疫応答に関しては

、細胞障害性Tリンパ球およびヘルパー細胞の両方が誘導される。

使用するエピトープを適切に選択することによって、多くの病原株に対して広い特異性を有する応答が誘発される。これは、例えばH I Vに見られるように、標的病原の株間で抗原構造に大きな多様性があるときに特に重要である。多くのH I V株に対して特異性の広い応答を生じるようにペプチドを設計する一つの方法は、同時継続のアメリカ合衆国特許出願07/760,530（その全体が参照として本明細書に組み込まれる）に記載されている。

従って、本発明の一つの目的は、広範囲のM H Cタイプを発現する複数の宿主において、Tヘルパー応答、細胞毒性リンパ球応答および高力化の中和性抗体の全てを誘発するペプチドを提供することである。

本発明のペプチドは、診断の目的においても有用である。例えば、実施例に開示した特定のペプチドは、H I Vに感染した個体において、Tヘルパー細胞、細胞障害性Tリンパ球およびB細胞（B細胞前駆体および成熟血漿細胞の両方）の免疫機能を試験する種々の試験フォーマットで用いることができる。従って、ここに記載するペプチドを試薬に用いる診断方法および免疫機能試験を提供することもまた、本発明の

目的である。

本発明のペプチドで免疫感作された宿主において誘発される広範囲の免疫応答によって、予防的または治療的の何れであれ、寄生性またはウイルス性の感染、特にH I V - 1感染に対するワクチンを提供することも、本発明の更なる目的である。

本発明の更なる目的は、寄生性またはウイルス性の病原、特にH I V - 1ウイルスに対して広範な免疫応答を誘発するような、哺乳類宿主を免疫化する方法を提供することである。

本発明のペプチド類は、例えばアメリカ合衆国特許出願第751,997号に記載されているような多重決定基Tヘルパーエピトープを有するペプチド、例えばアメリカ合衆国特許出願第07/874,311号または第07/148,692号に記載されているような細胞障害性Tリンパ球（C T L）エピトープ（好ましくは種々の標的ウイルス

株と交差反応するCTLを誘発するもの)を有するペプチド、および中和性交代を誘発する決定基(主要な中和性決定基(PND))を有するペプチドの共有結合性リンケージを含んでいる。夫々の場合におけるエピトープ類は、広範な主要組織適合性複合体抗原(MHC)を有する宿主によって認識されることが示され得るエピトープ類である。このMHCは、ヒトではHLAとも称され、組織移植片が宿主によって受容されるかまたは拒絶されるかを部分的に決定する細胞表面タンパクである。MHCタンパクは、免疫応答の初期段階において、免疫系に対する抗原の提示に関与

している。本発明のペプチド類が多くの変ったMHCまたはHLAタイプによって認識されるという事実から、それらのペプチド類は当該宿主ポピュレーションの大部分において有効であることが期待される。

更に、本発明のペプチド類は、当該抗原に対する高力価の中和性抗体であって、その配列が該抗原に由来している抗体を誘発するという性質を示す。本発明のペプチドを用いたウイルス感染個体の免疫機能を評価する方法は、個体から単離して当該ペプチドと共にインキュベートした細胞の応答を測定するイン・ビトロ試験である。例えば、患者から取り出した抹消血液細胞を本発明のペプチドと共にインキュベートし、これに特異的に応答したサイトカイン類の放出を測定することによって、活性を評価することができる。測定すべき好ましいサイトカインはインターロイキン-2(IL-2)である。測定方法は、当該技術において公知の何れの技術であってもよく、例えば、インキュベートされた抹消血液細胞の培養上清中において、インターロイキン-2依存性細胞ラインの増殖を測定することである。或いは、IL-2(または他のサイトカイン類)のELISA試験を行うことができる(本明細書の一部として組み込まれる合衆国特許出願第07/751,998を参照のこと)。本発明のペプチドを用いた免疫化方法は極めて単純であり、例えば一以上の本発明のペプチドおよび薬学的に許容され得るキャリア溶液もしくはアジュバントを含む滅菌組成物を静脈注射すればよい。或いは、当該ペプチドは、同時継続のアメリカ合衆国特許出願第08/032,494

号（その全体が参照として本明細書に組み込まれる）に記載されているように、放射線照射された抗原提示細胞の表面に結合させて投与することができる。

〔図面の簡単な説明〕

図1 A, 1 B:

クラスターペプチド6～18での免疫感作に続く、4つの異なったMHCハプロタイプのマウスのP18特異的な抗体応答。（a）20ナノモルのペプチドで免疫感作した31日後の一次抗体応答（21日でのレベルは低かった；結果の項を参照のこと）。（b）一次免疫の37日および49日後における、10ナノモルのペプチドの追加免疫に対する二次免疫応答。予出血プール(prebleed pool)を示す+を除き、記号は個体マウスに対応する。

図2 A-2 H:

ペプチドPCLUS6-18での単一の免疫感作の31日後における、4つのマウス株のHIV-1・III B中和特性。

図3 A-3 D:

一次免疫から39～42週後に10ナノモルのPCLUS6-18を用いて単一の追加免疫を行った10日後の、4つのマウス株のHIV-1・III B中和特性。図2に夫々番号を付した血清について、 V_n/V_o が希釈逆数に対してプロットされている。動物番号および記号は、一次反応に関して図2で用いたものに対応するように表されている。なお、

マウス株BALB/cに関する縦軸は他の株とは異なっており、他の株での終点は1:4096であるのに対して、BALB/cについての終点は1:32,768である。

図4 A, 4 B:

ペプチドおよび全タンパクに対する抗体の親和性を試験するために、p18およびrgp120を拮抗剤に用いた拮抗結合曲線。黒塗りの記号は、試験された一つの希釈において>90%の中和活性を有する血清を表し、また白抜きの記号は試験した最低希釈において<90%の中和活性を有する血清を表す。データは、3～4の実験の代表値である。

図5 A, 5 B:

PCLUS3-18 (図5A) 及びPCLUS6-18 (図5B) で免疫感作されたマウスにおける、中和性血清 VS 非中和性血清の詳細な特異性。中和性血清 (黒塗り棒) 及び非中和性血清 (白抜き棒) が、P18置換ペプチドでコーティングされたウェルでのELISA試験を用いて試験された。HIV-1・IIIB配列 (RIQRGPGRFVTIGK; 配列番号7) の一つのアミノ酸を、HIV-1・RF (**TKGPGRVIYATGQ; 配列番号8) の対応アミノ酸で置換した15のペプチドが、ウェルのコーティングに用いられた。二つの配列が同一であるときはAlaで置換された。これらのペプチドは、18-1から18-15と称され、二番目の番号が配列中における置換位置を示している。夫々の図における数字の下文字は、P18/IIIB配列の対応位置において置換された、RF配列由来のアミノ酸 (ま

たはAla) を示す。星印は欠失を示す。血清は、希釈率1:1000で比較された。

図6A, 6B:

中央のV3ループ内で置換されたP18変種に対する結合。位置3-10で置換されたペプチド18変種 (表Vに示すもの) が、マイクロタイターウェルのコーティングに用いられ、ELISA試験で血清の結合が試験された。夫々の図における数字の下文字は、P18/IIIB配列の対応位置で置換された、RF配列由来のアミノ酸 (またはAla) を示す。黒塗りの棒は中和性抗体を表し、白抜きの棒は非中和性血清を表す。縦軸 (カラム) は置換されたペプチド vs P18に対する結合の、405nmでの平均吸光度の比率を表しており、このデータは、PCLUS3-18 (図6A) またはPCLUS6-18 (図6B) で免疫感作された動物から採取した個体血清 (数字で指定した) について2回測定して得たものである。

図7A-7C:

QS21アジュバント中の合成ペプチド (compound peptides) を用いた免疫感作による、HIV-1エンベロープgp160特異的CTL活性の誘導。各実験において、15-12のトランスフェクトされた標的細胞が用いられた。即ち、図7Aは、B10.D2マウス由来のCTL; 図7Bは、B10.A (5R) マ

ウス；図7Cは、B10.S(9R)由来のCTLである。三つのウェルにおける平均の標準誤差(SEM)は、一貫して平均の8%未満であるから、明瞭さを重視して誤差を示すバーは省略してある。

図8A, 8B:

CTLのプライミングのための、ヘルパーとCTL決定基との間の結合に関する要件。B10.D2マウス(図8Aおよび8C)またはB10.A(5R)マウス(図8Bおよび8D)に由来するCTLを、標的としての15-12のトランスフェクト細胞と共にインキュベートし、P18+インターロイキン2を用いてイン・ビトロで再刺激し(図8Aおよび8B)、または標的としてのP18パルスされたBALB/c・3T3繊維芽細胞と共にインキュベートした。

図9A, 9B:

合成ペプチド構築物での免疫感作によって誘導された、CTLエフェクター(図9A)およびヘルパーT細胞(図9B)の発現型。図9Bにおいて、免疫感作はPCLUS4-18を用いて行われた。

図10A-10B:

PCLUS3-18MNで追加免疫された血清(図10A-10D)およびPCLUS6-18MNで追加免疫された血清(図10E-10H)の、HIV中和活性を示している。

図11A-11H:

PCLUS6-18MNで追加免疫された血清(図11A-11H)およびPCLUS6.1-18MNで追加免疫された血清(図11E-11H)の、HIV中和活性を示している。

図12A, 12B:

種々のアジュバント中に含有されたP18-MNおよびPCLUS3-18MNでの免疫感作によって誘導されたCTL応答を示している。

図13A, 13B:

種々のアジュバント中に含有されたP18およびPCLUS6.1MNの2

回の免疫感作に続く、CTL応答を示している。

〔発明の詳細な説明〕

中和性応答を増強するための補助を提供する研究において、我々は、クラスターペプチドをPND内に含まれるペプチド18 (P18) に直接連結した。P18は、HIV-1・III B・gp160のアミノ酸残基308-322からなっている [配列の番号付けは、Los Alamosデータベース (43) に従った。これは、我々が以前に用いたRatner et al. (42) の番号付けよりも7少ない]。P18はまた、免疫優勢な細胞障害性のT細胞部位を含んでいる (45, 46)。P18領域に対して相同性であるgp160エンベロープタンパクの領域 (III B以外の他のHIV株に由来するもの) が、同様の方法で用いられ得ることを理解すべきである。例えば、実施例IIIは、免疫原ペプチドにおけるCTLEピトープとして、MN株のP18領域を用いたときに得られた結果を示している。HIVの種々の株に由来するP18領域の代表的なペプチド類は、同時継続中のアメリカ合衆

国特許出願第07/847,311号に記載されている。

ハプテンペプチドの免疫原性は、Tヘルパー決定基に対する線形重台または結合によって増大することが示されている (47-49)。当該クラスターペプチドは、多重MHCハプロタイプにおける補助を提供するにちがいない。これらペプチドの幾つかで1回追加免疫した直後に、幾つかのMHCタイプのマウスにおいて、著しく高い中和力価が得られた。我々は更に、ペプチド18に対する中和性抗体の詳細な特異性および親和性を調べた。このアプローチは、HIV感染の免疫予防および免疫治療に用いる合成ペプチドワクチンのためのペプチドの設計に用いることができる。

以下に記載する実施例において用いた材料および方法の幾つかは、2以上の実施例において用いられる。これらの材料および方法について、一般的な材料および方法として説明する。

一般的な材料および方法

〈ペプチドの合成〉

クラスターペプチド／ペプチド-18構築物およびTヘルパー／ペプチド-18構築物は、表Iに示した配列（配列番号1～6）に従い、t-boc化学を利用して、ペプチド自動合成機（No.430A；アプライド・バイオシステムズ社、フォスターシティ，CA）で合成した。ペプチドはHFを用いて樹脂から切り離され、サイズ排除クロマトグラフィー（P4バイオゲル；バイオラッド・ラボラトリーズ社、マウンテンビュー，CA）によって初期精製された。 μ ボンダパ

ック（ μ bondapack）逆相C18分析および調製用カラム（ウオーターズ・アソシエーツ社、ミッドフォード，MA）によって、単一ピークになるまで精製が行われた。ペプチド55-18は、環化してピログルタミン酸の形成をもたらすN末端のGlnを回避するために、N末端のエキストラAlaを用いて合成された。

表 I

HIV-1 III B のペプチド18に連結されたTヘルパー部位の配列

ペプチド	配列*	ペプチド18	MW (ダルトン)
PCLUS 1-18 (102-121)	EQMIIEDIISLWDQSLKPCVK	RIQRGPGRAFTIGIK (308-322)	4038
PCLUS 3-18 (421-441)	KQIIMWQEVGKAMYAPPIGQIR		4397
PCLUS 4-18 (476-499)	FDNWRSELYKYKVVKIEPLGVART		4501
PCLUS 6-18 (821-853)	AVNEGTDREVIVVQGYRRIIRHIPPRIROGLER		5425
P 53 (827-841)	DRVIEVVQGYRRIIR		3383
P 55† (834-848)	AQGAYRRIIRHIPPRIIR		3573

* HIV-1 III B の番号付けは、Los Alamos タンパク配列データベース (43) に従った。これらのペプチドに対する以前の番号 (42) は、Ratner 番号付けシステム (44) を用いた。

† ペプチド55-8は、ヒロウイルスの形成を回避するためにN末端に付加されたアラニンと表に示されている。

個々のエピトープまたは多重決定基のエピトープを含むペプチドは、上記のようにこれらを共線形ペプチド(colinear peptide)として合成することによって、一緒に結合することができる。或いは、側鎖カルボン酸基およびアミノ基は、ペプチド結合の形成のために用いられ得る。側鎖を介したペプチドの結合によって

、分枝構造を有する免疫原が提供される。第三の態様においては、ペプチドは非ペプチド結合によって連結され得る。ペプチドを結合するための幾つかの方法は、当該技術において周知である。このような一つの方法は、アメリカ合衆国特許第4,886,782号に記載されている。

〈マウス〉

B10バックグラウンドでのH-2類遺伝子マウス(H-2 congenic mice)をジャクソン・ラボラトリーズ社(バーハーバー、ME)から購入し、またはバイオコン・インク社(BioCon Inc., ロックウイル、MD)の我々のコロニーで繁殖させた。この研究で用いたマウスは8~20週齢であった。

〈ELISA〉

丸底の可撓性PVCマイクロタイタープレート(#3912 Falcon Labware、オックスフォード、ME)のウェルを、夫々10 μ Mのペプチド18、置換されたペプチド18、クラスターペプチド3、クラスターペプチド6、0.2 μ g/mlの組換えgp120(ABT、アドバンスト・バイオテクノロジー社、MA)またはpH 9.6の0.1M炭酸緩衝液中の2 μ M鯨精液ミオグロビンの各100 μ lを用いて、4℃で

一晚コーティングした。組換えgp120プレートを、0.2 μ g/mlのアフィニティー精製されたrgp120(ABT)を炭酸緩衝液中に含有させたもの100 μ lを用いてコーティングした。このプレートを、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中の1%BSAを用いて4℃で1~1.5時間ブロック処理し、0.05%トウイーン20およびBSAを含有するPBS(PBSTB)で洗浄した。次に、100 μ lの被検血清を二つのウェルに添加し、4℃で1~1.5時間インキュベートした。この被検血清は、1:100~1:10,000のPBSTB中に10倍希釈した状態で試験された。次いで、自動プレート洗浄機(バイオラッド社、モデル1550)を用い、ウェルを200 μ lのPBSTBで10回洗浄し、1:7500でPBSTB中に希釈した100 μ lのアルカリホスファターゼ結合ヤギ抗マウスIgG(プロメガ社、メジソン、WI)と共に4℃で1時間インキュベートした。10回洗浄した後、基質として100 μ lの1mg/mlパラニトロフェニルホス

フェートを添加することによって結合抗体を検出した。405 nmでの光学密度をELISAリーダーで読み取った。関連抗体でコートしたウエルでの405 nmの光学密度から、無関係の鯨精液ミオグロビンでコートしたウエルでの405 nmの光学密度を差し引いたものとして、特異的吸光度が測定された。ヤギ抗マウス μ 鎖特異的抗体（シグマケミカル社、セントルイス、MO）に続いて、アルカリホスファターゼ結合抗ヤギを用いることにより、ペプチド18に特異的なIgMが検出された。ビオチン結合ラット抗マウスモノクローナル

抗体として、LO-MG1-13（IgG1）およびLO-MG2a-3（IgG2a）（バイオソースインターナショナル社、ウエストレイク・ビレッジ、CA）を用いることにより、全IgG、並びにアイソタイプIgG1およびIgG2aが検出された。ストレプトアビジンアルカリホスファターゼ（シグマ・イムノケミカルズ社、セントルイス、MO）の添加に続いて、基質を添加し、プレートをELISAリーダーで読み取った。

以下に、実施例により本発明を詳細に例示する。これらの実施例は本発明の好ましい態様として例証として提示されるものであり、如何なる形でも本発明の限定を意味するものではない。

例I：HIV-1に対する高力価中和抗体を産生させるためのマウスの免疫感作

本発明のペプチドは、該ペプチドで哺乳類宿主の免疫感作をすることにより、標的抗原に対して高力価のAbNを産生させるために用いることができる。この例においては、HIV-1エンベロープ糖タンパク質gp120の配列に由来するペプチドを用いて、マウス中で高力価のAbNを誘発させる。

免疫感作。マウスを、フロイントの完全アジュバント（CFA）中に1：1でエマルジョン化した20ナノモルのそれぞれのペプチドの腹腔投与によって免疫感作した。21日目および31日目の時点で、免疫感作後の血液を眼窩後方からの採血（retroorbital bleed）により採取し、凝血させ、血清を除き、-20℃で冷凍した。1次免疫感作の21日後から31日後の間にも、抗体レベルはいまだに上昇し続けることが分かったので、31日目の血清での結果を報告する。1次

免疫感作の36-52週後に、腹腔内へのCFA中の10ナノモルのペプチドにより選択されたグループの動物を追加免疫し、一般的に2次応答が最適になると知られている、10-11日後に採血された。

HIV-1の中和アッセイ。CEM-SS細胞を用いての、伝染性の定量的マイクロアッセイを、すでに記載されている(52)ように行った。要約すれば、H9細胞の対数増殖期の培養によって得られた、最適に増殖した200シンシチウム形成単位(SFU)のHIV-1-IIIB株またはHI

V-1MN株を含有し、かつ予め低温保存して力価測定された $50\mu\text{l}$ の培養上清に対して、熱不活性化(56°C , 30分)試験血清 $50\mu\text{l}$ の連続2倍希釈系列を混合し、この混合物を室温で30分間インキュベートした。その混合物を 5×10^4 細胞のDEAE-デキストラン処理されたCEM-SS細胞を含んでいる二重ウェル(duplicate wells)に加えて、 37°C で1時間おいた後、ウイルスと抗体との混合物を除き、培地を取り換えて、完全培地のみで5日間(HIV-1-IIIBについて)、または4日間(HIV-1MNについて、それぞれのウイルス株にとって最適であることが確定している)、細胞を5% CO_2 の下に 37°C で培養した。感染ウイルスの単位を、倒立顕微鏡の下での被感染細胞の、続いて起こるシンシチウム形成から定量した。逆数幾何(相乗)平均中和力価は、HIV-1の指摘された株に感染した対照CEM-SS/HIV-1感染細胞の90%超よりも多く(すなわち $V_n/V_o < 0.1$)においてHIV-1フォーカスの阻害が可能である血清希釈として表現された。このアッセイは、最初のインキュベーションにおいて細胞から遊離しているウイルスの中和を測定するものであって、感染ウイルスの計数についての読取りにすぎないような、シンシチウム形成の阻害を測定するものではない。CEM-SS細胞に対する、血清单独での細胞増殖抑制性または毒性は、試験された最高濃度においても観察されなかった。 56°C での30分間の熱不活性化により、マウス血清の非特異的中和作用が除かれることもまた示されている(53)。

蛍光による直接結合の定量。天然のgp120に対するペプチドに誘導された

抗体の結合を評価するために、選択された中和血清および非中和血清の連続10倍希釈系列が、生存細胞免疫蛍光定量法(IFA)において、HIV-1-IIBが豊富に感染した細胞の表面上に発現したウイルスgp120について試験された(52)。

拮抗ELISA結合曲線。結合性試験は、無菌のポリプロピレン試験管内で、125 μ lの、1%卵アルブミンおよび0.05%トウイーン20を含有するリン酸緩衝生理食塩水(pH7.2)に含まれる異なる希釈度のp18(0-20 μ M)またはrgp120(0-160 μ M)と、125 μ lの、上記と同じバッファーに含まれる、抗体希釈度に対して吸光が直線領域にあることが確認されている一定希釈度の抗血清とを混合することにより実施された。穏やかに振盪しながら40℃で一夜インキュベーションをした後、100 μ lの量を拮抗抗原p18またはgp120のそれぞれでコートしたマイクロタイター・プレートの二重ウェル(duplicate wells)に加え、40℃で20分間インキュベートし、標準ELISAアッセイを行った。市販のソフトウェア・プログラム(バイオメトリックス社(Biometalics Ink.)製、プリンストン、ニュージャージー州)を用いて、吸光度に対する血清希釈度の対数の、パラメーターが4つのロジスティック関数を用いた結合曲線を作り、個々の血清の解離定数(K_d 値)を算出し、決定した。

P18置換ペプチドへの結合。中和血清および非中和血清

の特異性を、プラスチック・マイクロタイター・ウェルにコートした15種類の置換されたp18ペプチド(37)への結合についての標準ELISAアッセイで試験した。

合成された多決定基ペプチド(表I)は、「クラスターペプチド」と称し(特定構築物の名称としてPCLUSと略称する)、それぞれは、すでになされた研究(42, 54, 55)において同定された、一部重複しながらも異なっている、短くなったTヘルパー決定基の団塊を構成している。この研究で用いられた3種類のクラスターペプチド、PCLUS3、4、および6を選んだのは、これらがI-A分子およびI-E分子の両方、並びに多様性(multiple)HLAタイプの

ヒトにおけるのとも異なって(42, 56, 57)、マウスの4種の独立のMHCハプロタイプにおいて増幅反応(proliferative responses)を誘発する基準を充足したためである。PCLUS1はマウスのB10.BR株のみに強く認識され、さらに36個体のHIV血清陽性・インフルエンザ陽性ドナーのうちの23個体においてIL-2産生を刺激した。HP53ペプチド(ロス・アラモス(Los Alamos)のデータベース(43)のナンバリングでは827-841残基であり、これはラトナー(Ratner)(44)が以前に用いたもの(42, 54, 55)よりも7小さい)並びにHP55ペプチド(834-848残基)は以前に、それぞれA^kE^kおよびA^bE^bハプロタイプ並びにA^kE^k、A^bE^b、A^dE^dおよびA^sE^sハプロタイプのマウスにおけるHIV-1IIIBエンベロープ配列のTヘルパーエピトープとして同定されて

おり、より長いPCLUSペプチドの中に含まれる。(E^bおよびE^sは、ここではそれぞれ、発現されたE_p^bE_p分子およびE_p^sE_p分子を指摘するために用いる。非多形性(nonpolymorphic)E_pは、純粋なH-2^bおよびH-2^sハプロタイプでは発現されないけれども、我々はE_pを発現する組換え株を用いた。)HP53ペプチド(env-TH4.1とも称する)もまた以前に、無症候性HIV-血清陽性ヒト患者の末梢血リンパ球におけるIL-2産生を誘発することが示された(57)。ペプチド18(308-322残基)は、主要中和決定基(PND)として知られているHIV-1-IIIBエンベロープの超可変V3ループ領域の範囲内に位置するB細胞エピトープであり、ヒトCTLにより認識されるのと同様(46)、マウスにおける主要免疫優性細胞傷害性T細胞エピトープである(45)。

クラスターペプチドのカルボキシ末端でペプチド18を合成することにより、合成ペプチドワクチン構築物が調製された。ペプチド18のみで免疫感作されたマウスにおいてはペプチド18に特異的な抗体が検出されなかったのに対し、20ナノモルの上記の構築物によるマウスの免疫感作により、ペプチド18への特異性が高められた抗体が産生された(表II)。クラスターペプチド3-18は試験された4株すべてにおいて抗体反応を誘発したが、逆の極性の構築物、即ち

、ヘルパー部位がP 1 8に対しC末端側であったP 1 8-クラスターペプチド3は、ペプチド1 8への抗体反応を有意に低いレベルで、しかもB 1 0. H T T-株のみにおいてしか誘

発しなかったので、Tヘルパー細胞およびB細胞のエピトープの向き(orientati on)が、構築物の免疫原性にとって必須であることが立証された。

表 II

20ナノモルのTヘルパー-P18、ペプチドによる1回の免疫感作の31日後の各株のマウスの血清中の抗VHBペプチド18に特異的な抗体の反応および中和活性

マウス株 ペプチド	D.A.D/c or D10.D2 (A ^b E ^b)		D10.D/R or D10.A (A ^b E ^k)		D10.HIT (A ^b E ^k)		D10.A(SIR) (A ^b E ^b)	
	EUISA	中和	EUISA	中和	EUISA	中和	EUISA	中和
P18	0.00	(0/5)	0.00	(0/5)	0.00	NT†	0.00	NT†
53-18†	0.05±0.03	NT	0.13±0.05	NT	0.78±0.00	(0/5)	2.30±0.03	22.0 (1/5)
55-18†	0.48±0.15	(0/5)	0.00	NT	2.47±0.25	22.6 (2/5)	0.32±0.23	NT
PCLUS 1-18	0.12±0.03	NT	0.68±0.04	16.0 (2/5)	0.13±0.05	NT	0.07±0.04	NT
PCLUS 3-18†	0.39±0.14† 0.45±0.17	10.6 (5/5) 9.5 (4/5)	0.50±0.09† 0.28±0.08	(0/5) (0/5)	2.70±0.30 0.51±0.22	32.0 (1/5) (0/5)	0.86±0.16 0.03±0.01	(0/5) NT
PCLUS 4-18	0.64±0.19	8.0 (1/4)	0.38±0.07	NT	0.61±0.16	(0/3)	0.16±0.04	NT
PCLUS 6-18†	0.84±0.12 0.77±0.13	9.5 (4/5) 42.2 (5/5)	0.94±0.24 0.80±0.06	12.0 (3/5) 32.0 (4/5)	0.88±0.23 0.16±0.07	11.3 (4/5) (0/5)	0.63±0.23 0.87±0.08	8 (1/5) 20.2 (3/5)

† 被験マウス血清の、血清希釈度1:1000でのP18特異的吸光度平均±S.E.M

1 対照.CE.M-55/HIV血感染細胞の90%超で、血VHB特異的7A-カスと阻害する

血清希釈度として表現した2逆数幾何平均血VHB中和抗体力価

(抗体力価陽性のマウス数/全被験数)

† NT 試験用11 B10.D2 おおび/対照B10.Aのマウス株採用

‡ PCLUS 53-18 おおび PCLUS 6-18 に 7A-2, 27 の異化は実験による

ほとんどの事例において我々の作成した構築物のTヘルパーペプチド成分は、以前の研究(54, 58)でこれらT細胞エピトープが増幅反応を誘発した株において、ペプチド18特異的抗体産生を助ける働きをした。ペプチド53-18およびペプチド55-18の例では、A^bE^bおよびA^kE^kハプロタイプがペプチド53-18に反応し、A^sE^s、A^dE^dおよびA^bE^bハプロタイプがペプチド55-18に反応した(表II)。加えて、A^sE^sマウスはペプチド53-18に

反応したが、 $A^k E^k$ マウスは、P 5 5 への反応において増幅することが以前に示されていた(54)にもかかわらず、ペプチド5.5-18に対する抗P 1 8抗体を作ることができなかった。P C L U S 1-18は、この研究で用いられた全4株のマウスにより認識されるTヘルパー細胞エピトープを包含し、B 1 0、B R-株のみにおいて強力な抗体応答を誘発し、かつ他の二株、B 1 0、D 2 およびB 1 0、H T Tにおいてわずかな抗体応答を誘発する。この事は驚くべきことではない、なぜなら、以前の我々の研究において(42)、クラスターペプチド1は単にその部分の総和ではなく、むしろ該クラスターペプチドよりも小さいその構成要素が増幅を誘発したいくつかの株において、増幅を誘発できなかったことが示されているからである。。大型のペプチドは、それ自体に折り重なってM H CもしくはT細胞レセプターとの相互作用を妨げるのかもしれないし、または構成要素のエピトープを破壊するような異なるプロセッシングを受けるのかもしれない。P C L U S 3-18、4-18、および6

-18は、E L I S Aにより定量したときに、少なくとも1つの実験において試験されたマウス全株において強いペプチド18抗体応答を誘発した。これらの結果は、B細胞エピトープを免疫優性T細胞エピトープのクラスターのカルボキシ末端に連結することにより、ほとんどの場合において、個々のエピトープのプロセッシングが利用され、且つ、誘発されたT細胞は特異的抗体の産生についてB細胞を助ける働きを為し得ることを示す。これらのクラスターペプチド-ペプチド-18構築物による単独免疫感作により高いレベルのP 1 8特異的抗体が誘発され得るので、我々は、ウイルスの攻撃の代りとなるであろう追加免疫により、増強されたペプチド18特異的抗体を生じる特徴的な2次免疫反応を生起させ得るか否かを調べることを試みた(図1)。応答が2次免疫感作よりも遅い1次免疫感作の後の21日目および31日目に血清を得たが、抗体レベルは31日目においてもまだ上昇し続けた。それゆえ、我々は、パネルAにおいて、20ナノモルのP C L U S 6-18で免疫感作され、免疫感作の31日後に採血された動物についての個体平均ペプチド18特異的吸光度を示し、これをパネルBの結果、即ち10ナノモルのP C L U S 6-18で1次免疫感作の37週後および49週後

に追加免疫されて、2次応答が通常はピークに達する11日後に採血された動物についての個体吸光度と比較した。追加免疫後に観察される抗体応答の増加は、2.5倍から12倍の間であった。

ワクチンにおけるこれらの合成ペプチド構築物の有用性を

評価するために、これらの構築物による単独免疫感作の後にペプチド18に対して誘発された抗体が、イン・ビトロでウイルスを中和することが可能かどうかを測定することが必要であった。対照CEM-SS/HIV IIB感染細胞に比較して90%超も多くHIV IIBの細胞遊離感染ユニットを阻害することが可能な逆数幾何（相乗）平均力価として現された中和活性が、特異的抗体による応答のあった株においてペプチド53-18、55-18およびPCUS1-18で誘発された。しかしながら、抗体は、53-18で免疫された動物5個体の中の1個体のみ、並びに55-18で免疫された動物およびPCUS1-18で免疫された動物の5個体の中の2個体のみにおいて中和作用があった（表II）。同群の中のほかの動物におけるELISAでの定量によって、ペプチド18特異的抗体が同レベルまたはより高いレベルであるにもかかわらず、このことが起きた。ペプチド18特異的抗体レベルの総和が中和とは相関性を有さないことの発見は、PCUS4-18で免疫された動物における株間比較にまで及んだ。前採血された(prebleed)対照に比較すれば、ELISAではすべての株が有意なレベルでペプチド18に対する抗体の応答を示すが、試験された最低希釈度で中和抗体を産生したのはBALB/c株の動物4個体の中の1個体のみであった（表II）。特異的なペプチド18抗体の応答と中和活性との間の相関性の欠如は、PCUS3-18で免疫された動物において特に明白である。ELISAで定量したところによれば、有意なレベルのペプチ

ド18特異的抗体が、PCUS3-18で免疫されたマウスのすべての株で誘発され、A^sE^sハプロタイプの動物が、この構築物への最強の抗体応答を示した。にもかかわらず、ELISAによれば抗体は低いレベルでありながら、H-2^dハプロタイプの動物においてのみ、抗体は、イン・ビトロでウイルスを中和す

ることが可能であった（動物10個体のうち9個体）。この発見から、B細胞エピトープ（ペプチド18）抗原による中和抗体のイン・ビボ誘発は、ヘルパーT細胞、または他のMHC結合調節因子の特異性のような補助のレベルに加えて、別の要因にも依存することが示唆される。

PCLUS6-18は、ELISA定量によれば有意な抗体応答を誘発した全被験株において再現性をもって中和抗体を誘発した（表IIおよび表III）。BALB/c（42.2）およびB10.BR（32.0）において達した幾何（相乗）平均中和力価は、相同の(homologous)生ウイルスの攻撃からチンパンジーを防御する上で十分であることが知られている、V3ループを作用対象とする中和活性のレベル（30）に相当する。PCLUS6-18での単独免疫感作の後の、各動物群についての2つの別の実験からの中和滴定のプロフィールを図2に示す。

それぞれの動物は腹腔内に、0.1ml量で、CFA中にエマルジョン化（1:1）された20ナノモルの合成ペプチドを投与された。中和活性は、HIV-1 IIB HX3株を用いて、マイクロカルチャー・シンシチウム形成アッセイにより定量され、 V_n/V_o で表現される（ここで V_n

は二重テストウェル(duplicate test wells)におけるシンシチウム形成単位(SFU)の平均値であり、 V_o は試験血清なしでインキュベートされた対照ウェルにおけるSFU値である)。それぞれの曲線は、一つの被験群のすべての動物の血清を含む前採血プール(prebleed pool)を除いて、個々のマウスの血清の連続2倍希釈系列を表す。2つの欄は、2つの別個の実験を表すものである。

第1のパネルに示されるBALB/cマウス5個体の中の3個体が、試験された最大の希釈度であった64を超えて、90%中和力価を有したことは注目値する。加えて、パネル3および4に示されるB10.BRマウス5個体の中の3個体が、64を超えて、中和力価を現した。クラスターペプチド6-18により免疫感作された全動物の半分より多く（22/40）において、1:64の希釈度での生ウイルスの50%中和が例証され、1例を除くすべてが、試験された希釈度の1つにおいてウイルスの50%を中和した。このB10.HTT株の動物

番号6269の1個体は、ほとんど免疫感作されていないように思える群において、免疫応答が無視し得るものであった。1次免疫感作に反応したマウスに対して、最初の免疫感作の37週または49週後に、CFA中の同じ構築物で単回の追加免疫が為された。この単回追加免疫により、多くの動物では1:2048-1:4096まで、幾つかにおいては1:16, 384まで90%中和が起こるという、中和抗体の注目すべき高力価が得られた(図3及び表IV)。単に2回の免疫感作(just two immunizations)の

後の相同の(homologous)ウイルス株に対するこれらの中和力価は、我々がこれまで観察してきたいかなる免疫感作により誘導されたポリクローナル血清の最高力価(8, 59)よりも、少なくとも4倍から8倍高い。さらに、時期の選択(the timing)から、1次免疫感作からの記憶が少なくとも11か月持続することが示される。さらに加えて、PCLUS6-18 IIIB(配列番号36)により追加免疫された4株の中の3株において、その血清は、とても低い力価であったが、HIV-1 MN株をもまた中和することができた(表IV)。H-2^dハプロタイプのマウスで、単回の追加免疫後にHIV-1 IIIBに対する最高の中和力価が得られることもある(例えば1:16, 384)が、これらの血清には、MN株に対する交差性中和活性を示したものはなかった。ある種の血清が高い中和活性を有し、同じ短配列に対して同様のELISA力価を持つ他の血清がそうでないのはなぜかを説明することを試みるために、我々は、それぞれのクラスターペプチド-ペプチド-18での免疫感作により産生された中和抗体および非中和抗体の親和性、アイソタイプ、精密な特異性および他の特性を比較した(表IIIにおいて要約されている)。全被験血清は、1種類の動物(B10.BR#9770)のものを除いて、90%阻害の基準によれば非中和的なものであっても、対照血清と比較しての50%阻害で評価することにより、希釈度によってはウイルスを中和し得ることになるということは重要であり、注意すべきである。このように、90%阻害では非中和的である血清であ

っても、中和血清の区別が分かり難くなるような低いレベルの中和抗体を有して

いるかもしれないので、特異性の差異を識別することはより困難になるであろう。

表 III
7729-87041-118 の感染性に対する中和抗体の検出性

7729- 87041 マウス株	血清	中和			HBB/119 結合 (IFA)	ELISA						結合親和性	
		90%	50%	MIN		p18	gp120	PCUS 3	PCUS 6	gpM(p18)	gpM(gp120)	p18	gp120
PCUS 1-18 BIO BR	6256	16	>64			0.81	1.66	0.29	0.16	0.59	0.63		
	4597	16	>64			0.67	1.69	0.14	0.09				
	4599	-	8			0.75	1.66	0.15	0.09				
	前様血7-14	-	-			0.00							
PCUS 3-18 BALB/c	6242	8	>64	陰性		0.49	1.17	0.09		0.35	0.38		
	6243	8	32			0.44	1.17	0.06		0.42	0.33	9.30E-07	7.19E-10
	6244	-	32		陰性	0.08				0.41	0.33		
	6245	16	>64			0.98	1.68	0.05	0.03	0.41	0.33		
BIO BR	6246	8	16	陰性		0.19	1.57	0.05	0.09	0.52	0.39		
	前様血7-14	-	-			0.13	0.20	0.03	0.02				
	6252	-	16			0.66	1.19	0.05	0.01				
	7803	-	8			0.31	1.19	0.04	0.07	0.43	0.59	0.63	
BIO HITT	7804	-	8			0.46							
	7806	-	16			0.10							
	6253	-	32			0.10							
	前様血7-14	-	-			0.12	0.20	0.05	0.02				
	7128	-	32			0.75						9.25E-07	5.14E-10
	7129	-	8		陰性	0.00							
	7130	-	16			0.84	1.58	0.05	0.09	0.56	0.56		
	7131	-	16			0.33	0.85	0.08	0.13	0.41	0.54		
	7132	-	16			1.16	1.67	0.08	0.12	0.56	0.57		
	前様血7-14	-	-			0.12	0.16	0.03	0.02		0.47		

表 III (続き)

BIU-A(SR)	4832 H3043 前採血7-1V	- - -	8 8 -				0.86 0.51 0.00	0.32 0.37 0.40			
PCLUS 4-18 BALB/c	9748 9749 9750 9752	- - 8 -	8 8 32 -				0.63 0.69 1.19 0.06	1.34 0.06 0.01			
BIU-A(SR)	9776 前採血7-1V	- -	- -				0.18 0.09	0.21 0.02 0.02			
PCLUS 6-18 BALB/c	6247 6248 6249 6250 6251 9753 9754 9755 9756 9757 前採血7-1V	32 8 8 16 - 32 32 32 16 -	>64 32 - >64 32 >64 >64 >64 >64 32 -	陰性	陰性		0.44 0.75 0.78 1.29 0.95 0.36 0.85 0.47 0.99 1.17 0.08	1.56 0.06 1.20 0.47 0.41 1.15	0.58 0.58 0.82	6.77E-07 3.88E-10	
UIU BR	6259 6254 6255	16 - 8	>64 64 32	陰性			1.10 0.37 1.14	2.07 1.22 1.33	0.05 0.00 0.00	0.87 0.46 1.23	0.43 0.36 1.23

表 IV

10ナノモルのクラスターペプチド-P18により追加免疫された血清の特性

クラスターペプチド/ マウス株	血清 #	ELISA		中和		MN	
		1:1,000	1:10,000	90% IIB	50% I	90% MN	50%
PCLUS 3-18 BALB/c	6243	0.44	0.08	8	32	-	-
	6244	0.64	0.12	256	>512	-	-
	6246	1.48	0.54	128	>512	-	-
PCLUS 6-18 BALB/c	6247	2.27	0.42	4068	>52,768	-	-
	6251	1.49	0.66	64	512	-	-
	9753	1.45	1.41	16,384	>52,768	-	-
	9754	1.47	0.72	16,384	>52,768	-	-
	9755	0.12	0.10	32	128	-	-
	9757	1.75	1.32	16,384	>52,768	-	-
B10.BR	7309	1.12	0.17	4096	16,384	-	-
	7367	1.25	0.34	4096	>52,768	-	-
	9768	1.64	0.41	1024	2048	-	>512
	9769	1.54	0.17	256	2048	-	-
	9770	1.50	0.36	256	2048	-	-
	9771	1.65	0.86	128	512	-	-
	9772	1.23	0.26	1024	>4096	-	>512
B10.HTT	7822	1.77	1.15	1024	>4096	128	512
	7828	1.42	1.10	2048	>4096	128	>512
	7829	1.39	0.68	512	>4096	128	>512
	7830	1.19	0.43	16,384	>52,768	-	-
B10.A (5R)	9777	1.49	0.76	2048	>4096	-	128
	9778	1.23	1.02	128	512	-	>512
	9779	1.35	0.41	512	2048	-	64
	9780	1.28	0.59	256	1024	-	256

異なる4株のマウスにおいて10ナノモルのクラスターペプチドをまたぎにより1回追加免疫した39-52週後の個々のマウス血清の405nmで測定されたELISA値および逆数希釈中和力価。

およそ50%の感染ポイントでの相同ウイルスの中和を、HIV-1 IIBを指示するIIB表示の欄に示し、交差中和作用を、HIV-1 MNを指示するMNの欄に示す。

* - は、被験最低希釈度の1:64での陰性を示す。

4 欄の結果は、免疫蛍光によるHIV I I B株感染細胞への直接結合を示す。中和力価とIFA力価との間には相関性はなかったが、クラスターペプチド6-18により免疫感作された動物由来の、シンシチウム形成アッセイにおいて90%までウイルスを中和することが可能である5血清のうちの3血清が、ウイルス感染細胞への結合を示した。PCLUS 3-18, #6245で、およびPCLUS 6-18, #6249で免疫感作されたマウスからの2つの中和血清は

、I F Aによれば感染細胞に結合できなかった。加えて、2つの非中和血清の1つである、P C L U S 6-18で免疫感作されたマウス#9770からの血清は、シンシチウム形成アッセイにおける50%阻害のレベルではいかなる中和活性も存在しないにもかかわらず、ウイルス感染細胞への結合を示した。この小さな試料においては、我々は、I F Aにより中和血清と非中和血清との間の差異を検出できなかった。

クラスターペプチドにより免疫感作された動物からの血清を、E L I S Aアッセイでr g p 120への結合について試験した。表I I IにおけるE L I S Aアッセイから吸光度を比較するのは、同じ縦軸の中の値の間でのみ妥当であって、異なる縦軸の間では妥当でないことに注意しなくてはならない。というのは、それぞれのタイプのE L I S Aに対して異なる試薬とアッセイ条件が用いられるからである。前採血された対照血清は結合しなかったが、試験された免疫血清はすべてr g p 120に結合し、中和血清と非中和血清との間に見られた有意なレベルの差は存在しなかった。加えて、P 1

8またはr g p 120に結合したI g Mのレベルにおいても血清の間に差異は見られなかった。小さな試料において、P 18に対して誘発された抗体のアイソタイプは、I g G₁であると決定された。被験血清に、アイソタイプI g G_{2a}のいずれかの抗体を示すものはなかった。アイソタイプと中和活性との間には相関性は見られなかった。

Tヘルパー部位に対して誘発された抗体は、引き続くウイルス感染においてもある役割を果たすかも知れないので、クラスターペプチド-ペプチド-18構築物により免疫感作された動物からの血清が、クラスターペプチドそれ自体への抗体を含むかどうかを確定することが重要である。さらに、もしもヘルパー部位に対する抗体が中和作用を有するならば、このことからペプチド18への結合と中和との間の相関性の欠如についての理由を説明できるであろう。我々は、クラスターペプチド3単独またはクラスターペプチド6によりコートされたプレートを用いて、E L I S Aによってこの可能性を試験した。被験動物血清には、P C L U S 3への結合を示したものはなかった。それに対し、対照動物には抗クラスタ

ーペプチド6抗体を産生するものはなかったが、PCLUS 6-18により免疫感作された動物はすべて、Tヘルパー部位に対して反応性を有する抗体を産生し、産生された抗体のレベルは、それらのペプチド18への反応に比例した。しかしながら、さらに後に考察されるように、gp41の細胞質内の尾部(intracytoplasmic tail)における位置およびMN株についての交差性中和作用の欠如(表III)からも、こ

れらの血清の中和活性がクラスターペプチド6に対する抗体によるものであったということはあるそうもない。このことから、この中和活性は、主として構築物のP18部分に対して向けられるのに違いない。

中和能力における相違が、抗体の親和性における相違に起因するものである可能性が残されている。この可能性について試験するために、定量的感染性シンシチウムプラーク形成アッセイにおけるウイルス中和能力に基づいて選択された血清を、様々な濃度のペプチド18またはrgp120と混合し、溶液相平衡に達するようにした。拮抗剤(competitor)の希釈物を、それぞれの抗血清の 10^{-3} 希釈物と溶液相平衡に達するように4℃で1夜インキュベーションを行った。次いで、ELISAアッセイにおいて、競合するペプチド18またはrgp120のそれぞれをコートしたプレート上で短時間のインキュベーションを行うことにより、遊離の抗体を定量した。50%最大競合(maximal competition)に必要な濃度(IC_{50})は、 K_d の概算値として、結合曲線からそれぞれの被験血清について決定された。それぞれの実験を3回から4回反復し、代表的な結果を図4に示す。全被験血清の結合親和性(Binding avidities) (K_d の逆数)は、rgp120で試験した場合、ペプチド18で試験した場合よりも対数で2以上大きかった(すなわち、対数で2小さい IC_{50}) (表III)。ペプチド18に対する中和血清および非中和血清の結合親和性は同等であり、rgp120に対する親和性における差異は決定的ではない。ひとつの事例においては、

クラスターペプチド6-18により免疫感作された動物のB10、BR株マウスナンバー9772からの中和血清は、対応する非中和血清のBALB/c株ナン

バー6251よりも、rgp120について5倍低い結合親和性を示した。それに対して、この同じ群のもう一つの中和血清であるB10. A (5R) マウスナンバー9777は、対応する非中和血清6251よりも1.4倍低い結合親和性しか示さなかった。結合曲線が予測されたほど急勾配でなかったという事実から、ペプチド18またはrgp120のいずれかに結合する抗体の集合体(the population)として、これらの血清は均質またはモノクローナルでなかったこと、並びに不均質性がこれらの結果に影響を及ぼしたかもしれないことが明らかになった。しかしながら、中和血清がしばしば非中和血清よりも低い親和性を有していたという事実から、中和作用は、ペプチドまたは組換えgp120に対する高い平均親和性とは相関性がないことが示唆される。

特異性の精密な差異(fine specificity differences)が、ペプチド結合作用が同等の血清の中和作用における差異を説明し得ることの可能性を検討するために、我々は、HIV-1-RF配列から1残基がHIV-1-IIIB配列における残基に置き換った、アミノ酸1つが置換したペプチド(表V参照、配列番号8-23)を用いて、PCLUS3-18、およびPCLUS6-18により免疫感作された動物からの中和血清および非中和血清の結合におけるそれぞれの残基の効果を調べた(図5)。

表 V
結合特異性の決定のために用いた置換ペプチド

(37)

	315													329
18IIB(P18)	R	I	Q	R	G	P	G	R	A	F	V	T	I	G
18RF	*	*	T	K	G	P	G	R	V	I	Y	A	T	K
18-1	*													
18-2		*												
18-3			I											
18-4				K										
18-5					A									
18-6						A								
18-7							A							
18-8								A						
18-9									V					
18-10										I				
18-11											Y			
18-12												A		
18-13													I	
18-14														A
18-15														

* 欠失を示す

† 下線と付されたアミノ酸は、18IIB配列における置換である。

ペプチド18のアミノ末端の置換もカルボキシ末端の置換も、PCLUS3-18またはPCLUS6-18により免疫感作された動物からの、中和血清（ベタ塗りの棒グラフにより表される）または非中和血清（白抜きの棒グラフにより表される）のいずれかによる結合には影響を及ぼさないらしい。実際のところ、位置番号11でバリンをチロシンに置換したときに、対照のペプチド18よりも結合が増強され、位置番号12、13、14、および15での置換でも同様に増強することが明らかとなった。ペプチド18配列PGRAFの、中央ループ領域において置換が為されたときは、両群の血清の結合は減衰した。この事は驚くべきことではない。なぜなら、配列GPGRが中和抗体に対する結合部位であり、極めて明瞭な形状の β 屈曲(β -turn)コンホメーションを保持することが示されているからである(60)。残基312においてグリシンをアラニンに置換（ペプチド18-5）しても結合に影響しないことは驚くべきことであった。残基313のプロリンをアラニンに置換（ペプチド18-6）しても、推定上の逆回転コンホメーションを破壊する点での効果にもかかわらず、結合性をさらに完全には無力化しなかったこともまた驚くべきことであった。最も興味深い置換は、置

換位置番号8、アミノ酸残基315においてであった。中和血清は、非置換ペプチド18に対する結合よりも有意に劣るとしても、この残基においてアルギニンアラニンに置換したペプチドに対する結合を保持したのに対し、非中和血清は、この置換ペプチドに対して結合しなくなった。我々は、追加

の血清を用いて、さらに該中央ループ領域を試験した。実験の結果を図6に示す。クラスターペプチド3-18により免疫感作された動物からの中和血清および非中和血清はともに(図6A)、6、7、8および9の位置で為された置換については結合の減衰を示した。しかしながら、非中和血清は結合しなかったのに対し、中和血清は、位置番号8で置換されたペプチドに対して、わずかな程度の結合を保持した。同様に、下側のパネルにおいては、PCLUS6-18により免疫感作された動物からの中和血清および非中和血清も、6、7、8および9の位置で置換が為されたペプチドに対する結合において劇的な減衰を示した。しかしながらやはり、中和血清は、位置番号8でアルギニンに対してアラニンが置換されたペプチドに対して、より高いレベルの結合を保持した。もう一つの実験においては、同じ程度に多くの置換について試験されたのではなかったとはいえ、中和血清と非中和血清との間の、8の位置の効果における差異はさらに顕著であった。315残基でのアルギニンのアラニンへの置換は、それが中程度の結合を保持するのが中和血清であることから、置換による影響は不明瞭である。しかしながらこの結果を、位置6および位置7での置換の結合に対する効果は非中和血清よりも中和血清の方が僅かながら大きいことと結び付けることにより、中和血清はループの頂部により強く集中され、非中和血清は中央ループに隣接するカルボキシ側により強く集中されるのであろうことが示唆される。この様に、細部の特異性における微妙な違いから、同程度にペプチドおよびgp

120への結合作用を有する血清の間の中和活性における差異が説明されるかもしれない。

本研究は、多様性(multiple)HLAタイプにおいて免疫原性が増強された合成ペプチドワクチンを構築することを目的とした、中和性B細胞エピトープと免疫

優性Tヘルパー部位のクラスターとを組み合わせることの有用性を証明する。本研究のために選ばれたTヘルパー部位は、HLAタイプの広範な系列(a broad array)を示すHIV感染患者からのヒトT細胞と同様に多様性(multiple)H-2タイプのマウスにより認識されることが以前に示されている、HIVエンベロップタンパク質gp160の多決定基領域を含む。我々の基本方針(strategy)は、それぞれのクラスターペプチドを、クラスI分子と共働してCD8細胞傷害性T細胞により認識される免疫優性部位であることが以前に同定され、且つV3ループ、すなわちHIV-IIIBエンベロップタンパク質の主要中和決定基領域の中に発見された、短い合成ペプチド(ペプチド18)に連結しようとするものであった。これら構築物、PCLUS3-18、PCLUS4-18、およびPCLUS6-18(表I)はすべて、1回の免疫感作後に、rgp120への結合が可能なペプチド18特異的な抗体を誘発した。これらの構築物の一つであるPCLUS6-18により免疫感作された、4つの異なるMHCハプロタイプを表すマウスからの抗体は、ウイルスを中和することが可能であった。PCLUS6-18により免疫感作された全株の動物の総和である35個体中の24個体(69%)において、1

回の免疫感作後に誘発された抗体は、90%よりも高い比率で、相同性(homologous)ウイルスの感染性を阻害した。試験された株の中の3つにおいて、PCLUS6-18は、ELISAによればペプチド-18特異的反応を示す動物の80-90%で中和抗体を誘発した。興味深く、注意すべきことは、ある実験において2つのハプロタイプのマウスで達した逆数幾何(相乗)平均中和力価($H-2^d$ において42.2および $H-2^k$ において32.0)は、チンパンジーにおいて静脈投与でのウイルスの攻撃に対して防御することが知られているレベル(30)に近いレベルであった。この平均値は低い概算値である、というのは、それぞれの群の多くの動物は、試験された最高希釈度であった64よりも大きな中和力価を有していたからである。さらに、1回の追加免疫の結果、我々の経験においてほかのいかなる免疫感作のプロトコールで(8, 59)見られたよりもはるかに高い、1:1000から1:16,000の90%中和力価が得られた。PC

LUS 3-18は、被験株すべてにおいてペプチド特異的抗体を誘発したが、しかしH-2^dハプロタイプの動物においてのみ、これらの抗体は一貫して中和性であった（マウス10個体の9個体）。

ELISAによるペプチド18またはrgp120のいずれかへの抗体の結合活性のレベルは、クラスターペプチド-ペプチド18構築物により誘発された抗体が中和性であるか否かを予見させるものではなかった。このことは、抗体応答の規模(magnitude)を増強するT細胞の補助のレベルに加え

て、他の要因が該構築体への質的な反応に影響を及ぼすことが示唆される。ELISAによれば同等のペプチド18結合活性の血清の間で、中和活性に著しい差異が結果として現れる機構を調べるために、我々は、特異性、親和性および抗体のアイソタイプを比較した。興味深いことに、動物はペプチドで免疫感作されているにもかかわらず、ペプチド18特異的抗体を含む血清はすべて、エンベロプタンパク質rgp120に結合する抗体をもまた高いレベルで含有した。この発見から、ペプチド18の短い合成配列の好ましいコンホメーションは、ある程度まで、それより大きなエンベロプタンパク質における対応領域のコンホメーションによく似ていることが示唆される。PCLUS 6-ペプチド18により免疫感作された動物からの5つの被験血清のうちの3つは、IFAアッセイにおいて天然のgp120を発現するウイルス感染細胞に結合したが、中和力価とIFAによる結合との間にはいかなる相関性も発見されなかった。さらに加えて、予想に反して、中和血清は、非中和血清よりもrgp120に対してわずかに低い結合親和性を示した。明らかに、gp120のV3ループへの結合の規模および親和性に加えて、他の要因が中和作用に影響を及ぼす。

このことを研究するために、我々はアイソタイプおよび精密な特異性(fine specificity)における差異を調べた。アイソタイプの差異は無かった。中和血清および非中和血清はともに、ペプチド18の中央ループ領域(PGRAF)での置換物に対する結合の減衰を示したが、とは言えその結果は、

ジャバヘリアン(Javaherian)ら(61)の経験に一致して、中和血清は該ループ

の頂部により強く集中し、非中和血清は該中央ループに隣接するカルボキシ側により強く集中することを示唆するものであった。

この研究での結果は、Tヘルパー部位（即ちT1ペプチド残基421-436）を、SP10と称する長いペプチド（即ち、V3ループの範囲内に位置する残基296-314）に結合することにより合成ワクチンを作成した以前の研究結果と両立する（62, 63）。この構築物により免疫感作された動物では、gp120エンベロープタンパク質への増幅反応も、異なる免疫感作の処方計画を用いた一連の免疫感作後の中和抗体もともに発現した。T1はPCUS3の範囲内に含まれているが、多決定基領域を表さず、またSP10はペプチド18と一部重複するが、中央ループのカルボキシ末端に向かう8残基を欠いている。V3ループは、中和抗体を誘発するウイルスエンベロープ上の唯一の部位ではないが（64-67）、直鎖状(linear)ペプチド配列により定義されることができ、且つその細胞レセプターであるCD4分子に結合した後にそれに対する抗体がウイルスを中和し得る主要部位であるように思われる（24, 61, 68, 69）。

この領域の超可変性から、この配列のどの程度の数の変異体がワクチンに含まなければならないかについての疑問が浮上する。北アメリカおよびヨーロッパの分離株からのウイルスのPCRでの研究から、比較的良く保存され、MNまたはSC分離株に極めてよく似たコンセンサス配列が存在する

ことが示唆される（24）。北アメリカおよびヨーロッパにおける被感染患者についての別の独立した研究において、被験者の大多数は、V3ループのMN様変異体に反応する抗体を有することが示された（70, 71）。該ループの比較的良好に保存された部分のGPGRFは、被験HIVの7分離株の4株を中和する抗体を誘発することが示されている（61）。分離株に特異的な中和は、一般にみられる。被感染患者における中和回避突然変異体の存在は、コンホメーション変化を導くループ外での配列変異と同様、V3ループ自体の内部での配列変異と関係があるかもしれない（33, 72）。合成ペプチドワクチンが、多くの感染分離株に対して適切な立体構造上の特異性を有する中和抗体を産生させる、分岐

した(divergent) V3 ループペプチドを含む多様な(multiple)構築物を含んでいなくてはならないということは、ありそうなことである。

本研究において、我々は、ワクチン接種の49週後までに停止されたPCLUS 6-18での追加免疫による免疫感作が、ELISAによれば、最初の応答の2.5-10倍の大きさの応答を導くこともまた示した。抗体レベルにおけるこの上昇は、中和力価において、90%中和については1:1000から1:16,000に至るさらに高い上昇と相関し、また50%中和についてもさらに高い上昇と著しく相関する(図3および表IV)。MN分離株において低い力価滴定値の交差反応性もまた観察された。追加免疫後5か月の時点で、ELISAにより測定されたP18に対する抗体の力価は、

高いプラトーの状態に止まっていた。

重要な問題は、PCLUS 3-18またはPCLUS 6-18による免疫感作が、Tヘルパー部位それ自体を対象とした抗体を誘発するかどうかを測定することであった。タンパク質全体に対しての抗体は、分子の取り込みおよびT細胞への提示を昂進することがこれまで示されてきたことから、Tヘルパー部位に対しての抗体が、T細胞レセプターが抗原提示細胞により提示される部位を認識することを遮断することはありそうもない。また、例外が報告されては来たが(77, 78)、T細胞エピトープに対する抗ペプチド抗体によるTヘルパー細胞への抗原の提示を遮断することは、通常は可能ではなかった(73-76)。我々は、クラスターペプチド6-18のTヘルパー領域に対して誘発される抗体があることを例証してはいたが、ワクチン接種36-52週後の1回の追加免疫に続いてこの構築物により免疫感作された動物において、反応の減衰を観察しなかった。もう一つの潜在的な関心事は、Fcレセプターおよび補体レセプターを媒介とした(16, 79)、ウイルスの感染性についての抗体媒介性の抗体増強である。gp41のN末端部分に結合することが分かったものもあるが(11, 79)、自然感染の間に、どの部位に対して昂進性抗体が誘発されるのか、現在は不明である。PCLUS 3に含まれる領域に対する抗体は、感染性を増強しないように見えた。クラスターペプチド6はウイルスエンベロープタンパク質の細胞質内

g p 4 1 領域の範囲内に位置しており、このことから、昂進性または中和性のい
ず

れかではとてもありそうにない。結局、2つの理由から、中和活性の多くがヘル
パークラスターペプチドに対して向けられていることはないであろうと我々は考
える。第1に、P C L U S 3-18構築物により免疫感作された動物からの中和
血清において、我々は、E L I S AによってはP C L U S 3に対する抗体を検出
できなかった。P C L U S 6-18により免疫感作された動物において、P C L
U S 6に対する抗体がいくつか検出されたが、これらは、ウイルス粒子上には発
現されないと考えられている g p 4 1 の細胞質内の尾部に対するものなので、ウ
イルスを中和できるとは考えにくい。第2に、P C L U S 3 または P C L U S 6
のいずれかに対する抗体は、もし中和作用があれば、H I V-1 の M N 株にも交
差中和作用を有すると考えられる。というのは、これらの領域は、中和抗体が一
般的にタイプ特異的となる P 1 8 領域と比較すれば、相対的に良く保存されてい
るからである。このように、交差中和作用の欠如（表 I I I）から、中和作用は
主に P 1 8 を対象とするものであり、ヘルパー部位を対象とするものではない。
加えて、別の研究において、P C L U S 3 ペプチドの主要部分を表現する T 1 ペ
プチドに対する抗体は中和作用と関係がないことが分かった（80）。

例II：H I V-1 に対する C T L を誘発せしめるためのマウスの免疫

H I V は細胞から細胞への伝染によって広がり得るので、合成ペプチドワクチ
ンを免疫療法の効果的な実施形態とするためには、ウイルス特異的な C T L 応答
を誘発せしめる能力が重要である。

例 I に記述されるペプチドは、T h エピトープおよび P N D に加えて C T L エ
ピトープを含む。このため、このペプチドを、マウスにおける C T L 活性の誘発
についても試験した。

ここで、我々は、我々が限定条件下においてヘルパーと C T L エピトープとの
間の共有結合的結合の必要性を試験することを可能にする、エマルジョンを必要
としないサポニンアジュバント、Q S 2 1（103）、を用いる単一の免疫で問

題を処理する。また、我々は、クラスII MHCにおいては異なるがCTL決定基を表わすH-2D^dクラスI分子を共有する類遺伝子マウス系を用いることによって、ヘルパー活性のMHC結合を扱った。

我々は、既に、HIVエンベロープタンパクgp160(42)由来の、多重決定領域に及ぶ免疫優性Thペプチドを取り巻く合成ペプチドの構築(54)を記述している。各々重複する決定基のクラスターからなる、これらの所謂クラスターペプチドが、多重MHC型のマウスおよびヒトにおいて、それぞれイン・ビトロT細胞増殖およびサイトカイン生成を誘発することが見出された(42)。この研究においては、3種類のクラスターペプチドを用いた：PCLUS3(42

1-444残基、KQIINMWQEVGKAMYAPPISGQIR、配列番号24)、PCLUS4(476-499残基、RDNWRSELYKYKVVKIEPLGVAPT、配列番号25)、およびPCLUS6(821-853残基、AVAEGTDRVIEVVQGAYRAIRHIPRRIRQGLER、配列番号26)である。ここで、HIV-1 III_Bナンバリングは、ロスアラモスデータベース(43)に従った(以前の刊行物(42)において用いたRatnerら(44)のものよりも7少ない)。

多重MHC型において免疫原性であるペプチドワクチンを設計し、イン・ビロにおけるCTLプライミング(priming)の機構を調べるために、各々のクラスターペプチドを免疫優性CTL決定基、P18(45)(308-322残基、RIQRGPGRFVTIGK、配列番号7)のN-末端で共に線状(co-linearly)に合成した。この決定基は、HLA型の広い列を発現するHIV-感染患者由来のヒトT細胞(46)に加えて、4種類の異なるMHC型のネズミCD8⁺CTL(104)によって認識されることが既に確認されている。P18ペプチドはgp160V3ループの一部およびgp160の主要中和決定(PND)領域に相当し(21-23)、また、クラスII MHC分子(I-A^d)によって、適当なMHC型のマウスにおいてヘルパーT細胞にも渡されている(105)。

クラスターペプチド-ペプチド-18構築体は、t-boc化学を利用する自

動ペプチド合成機 (モデル 430A ;

Applied Biosystems, Foster City, CA) で合成した (51)。このペプチドを、HF で樹脂から切り出し、最初にサイズ排除クロマトグラフィーで精製した。 μ ボンダパック (μ bondapack) 逆相 C18 カラム (Waters Associates, Milford, MA) 上での逆相 HPLC によって単一ピークまでの精製を達成した。8-20 週齢のマウスを、QS21 ($15 \mu\text{g}$) と混合した各ペプチド 20 ナノモルを用いて、尾幹皮下で免疫した。この QS21 は、シャボンの木 *Quillaja saponaria* 由来の高度に精製したサポニン画分であり、もっとも高いアジュバント活性を保持するが非毒性である (103)。単一免疫の 2 週間後、B10.S (9R) ($H-2^d$) (図 7A)、B10.A (5R) ($H-2^{k}$) (図 7B)、または B10.S (9R) ($H-2^{k}$) (図 7C) マウス由来の免疫脾臓 (24 ウェル培養プレートにおいて、完全 T 細胞培地 (10% FCS、2 mM L-グルタミン、100 U/ml ペニシリン、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン、および 5×10^{-5} M 2-ME を含有する、RPMI 1640 および EHA 培地の 1:1 混合物) 中、 $5 \times 10^6/\text{ml}$) を、0.1 μM の P18 および 10% ConA 上清含有培地 (Rat T stim; Collaborative Research, Inc., Bedford, MA) を用いてイン・ビトロで 6 日間再度刺激した。 ^{51}Cr 標識された標的を用いる 6 時間アッセイで、イン・ビトロ 2 次 CTL の細胞溶解活性を以前記述した通りに測定した (104)。この線維芽細胞標的は、全 gp160 タンパクを内在的に発現する BALB/c. 3T3 形質導入体 ($H-2^d$ 、クラス I MHC⁺、

クラス II MHC⁺) (細胞株 15-12 (参考文献 (45))) であった。同様の結果が、ネオマイシン耐性遺伝子 (18 neo 細胞) のみを形質導入し、1 μM P18 でパルス (puls) した対照 BALB/c. 3T3 細胞を用いて得られた (データは示さず)。gp160 形質導入体およびペプチドパルス 18 neo 細胞の両者の対照として、特定のペプチドがない状態における非パルス 18 neo 標的細胞を用いるバックグランド溶解は 8% 未満であった。イフェクターをペプチ

ドーパルス標的と、示されたE:T比で共培養した。特異的 ^{51}Cr 放出の割合を、 $100 \times ((\text{実験による放出} - \text{自発的な放出}) / (\text{最大放出} - \text{自発的な放出}))$ として算出した。最大放出は、5%トリトンX-100を添加することによって溶解した細胞の上清から決定した。自発的な放出は、イフェクター細胞を添加することなくインキュベートした標的細胞から決定した。このアッセイを、ウェル当たり5000標的細胞を用いて、3回繰り返して行なった。

このように、クラスIIにおいて異なるが、クラスID^d分子を共有する3種類のハプロタイプのマウス、B10.D2 (H-2^d; A^dE^d)、B10.A (5R) (H-2^{1s}; A^bE^{b/k})、およびB10.S (9R) (H-2^{t4}; A^sE^{s/k})を、化合物ペプチド、PCLUS3-18, PCLUS4-18、もしくはPCLUS6-18を含有する精製サポニン、またはP18のみを用いて、尾幹皮下で一度免疫した。それらの免疫脾臓を、IL2の存在下において、イン・ビトロでP18を用いて再度刺激した際に、全gp160タンバ

クを内在的に発現する形質導入BALB/c 3T3線維芽細胞標的(15-12と呼ばれる; 参考文献(45)) (図7)の両者は殺すことができるが、対照BALB/c 3T3線維芽細胞標的(18neoと呼ばれ、ネオマイシン耐性遺伝子のみが形質導入されている)は殺さないCTLが得られた。それらはまた、ペプチドP18でパルスされたgp160-陰性18neo細胞(図8参照)をも殺すことができ、これはこの殺害がP18残基に特異的であることを証明している。イン・ビボで化合物ペプチドによって感作したマウスは、7:1という低いイフェクター:標的(E:T)比で、P18パルス標的の他に15-12に対する強いCTL活性を生じ、60:1のE:T比で45-75%のレベルの特異的溶解に達した(図7A、B、C)。反対に、P18のみで免疫されたマウスは、60:1の最大E:T比でさえも最低限のCTL活性を示すのみであった。15-12標的殺害のE:T比曲線におけるシフトは、化合物ペプチドで感作したマウスにおける、イン・ビボにおいてP18のみで感作したマウスと比較して10倍を越える数のCTL溶解単位を示している。非免疫マウスまたはアジュバントもしくはペプチドのみで免疫したマウスもまた、CTLに到達せしめることが

できなかった。また、P 1 8成分を持たないクラスターペプチドも特異的C T Lを引き起こすことができなかった。Q S 2 1と混合したP 1 8のみで免疫したマウスにおいてP 1 8に対するC D 8⁺ C T L応答が著しく減少するか、もしくは存在しないという発見は、イン・ビボにおけるP 1 8特異的C T Lの

誘発にC D 4クラスIIに制限される助力が必要であり、この助力がクラスターT h決定基を有する化合物ペプチドを用いた免疫によって与えられる可能性を提示した。

C T L決定基へのヘルパー決定基の共有結合的な結合がイン・ビボにおいてマウスにC T L応答を誘発せしめるために必要であるのか、あるいは、共有結合的に結合はしていないペプチドの混合物で十分であるのかどうかを試験するために、B 1 0. D 2またはB 1 0. A (5 R) マウスを化合物ペプチドP C L U S 3-1 8もしくはP C L U S 4-1 8の各々で、または遊離ペプチドP C L U S 3もしくはP C L U S 4およびP 1 8の混合物で、またはP 1 8単独で、Q S 2 1アジュバントに加えて免疫した(図8 A-8 D)。マウスを、P C L U S 3-1 8もしくはP C L U S 4-1 8の各々で、またはP C L U S 3もしくはP C L U S 4およびP 1 8の混合物で、またはP 1 8のみで、Q S 2 1アジュバントに加えて免疫した。免疫したマウスに由来する脾臓細胞を、0. 1 μ M P 1 8およびr I L 1 2 (1 0単位/ml、Genzyme、Cambridge、MA)で6日間再度刺激した。g p 1 6 0形質導入株1 5-1 2(図8 A、8 B)または、P 1 8でパルスされた(1 μ M 一晚)、neoのみが形質導入されている3 T 3線維芽細胞(図8 C、8 D)についてイフェクターの試験を行なった。ペプチドの非存在下における対照1 8 neo線維芽細胞に対するバックグランド溶解は8 %未満であった。3回繰り返したウェルのS E Mでは、平均の7. 2 %未満であった。

このように、イン・ビボにおいてこの発明によるペプチドで免疫された脾臓細胞をP 1 8およびI L-2で再度刺激した。これは、(培養物中にT h細胞が存在しないので)イン・ビトロでのT細胞の助力における不足を補う。内在的にg p 1 6 0を発現する形質導入された1 5-1 2線維芽細胞株、およびP 1 8でパ

ルスされた、もしくはペプチドでパルスされていない対照18neo線維芽細胞の両者について、細胞溶解活性を測定した。ペプチドが存在しない条件下では、対照標的に溶解は観察されなかった。驚いたことに、混合物もしくはP18のみで免疫されたマウスに由来する免疫脾臓細胞のCD8⁺CTL活性は、化合物ペプチドでの免疫が両株において強いCTL応答を引き出したのに対して、無視できるものであった(図8A-8D)。P18のみでパルスされた標的の溶解は、PCLUS3もしくはPCLUS4でパルスされた標的に対するCTL活性の欠如と共に、結合要求がP18決定基に特異的なCTL活性の誘導に適合することを示しており、そのため、化合物ペプチドによって誘発され、gp160-発現標的について観察されるいくつかの他の活性によるものではない。これらの結果は、イン・ビボにおけるCTLの誘発に、化合物ペプチドPCLUS3-18およびPCLUS4-18中のCTL部位へのヘルパー部位としてのクラスターペプチドの共有結合的な結合が必要であることを示している。この発見は、3つの独立した実験において、一貫して再現可能であった。

化合物ペプチドでの免疫がCD4⁺CTLを誘発するは

ずであるので、このペプチドによって誘発される特異的なCTLの表現型を決定した。図9Aは、15 μ g QS21中20ナノモルの化合物ペプチドで免疫されたB10.D2およびB10.A(5R)マウス由来のCTLを、抗-CD8モノクローナル抗体(3.155;ラットIgM)(114)および補足物(黒塗りの棒)または抗-CD4モノクローナル抗体(RL.174;ラットIgM)(113)および補足物(白抜きの棒)、または補足物のみ(図示せず)のいずれかで以前記述した通り(28)に処理し、標的として18neoでパルスされたP18に対して試験した場合の結果を示す。

図9Aに示されるように、このCTLは通常のCD8⁺CD4⁻CTLである。また、標的がクラスIIではなくクラスI MHC分子のみを発現するので、このCTLはクラスI MHC分子によって制限されなければならない。この制限は、各H-2^dクラスI分子で形質導入されたL-細胞を用いてD^d分子にマップされた。

反対に、PCLUS-18構築物によって誘発されるヘルパー細胞は、少なくとも免疫脾臓細胞のイン・ビトロ刺激における測定ではCD4⁺であった。例えば、B10.A(5R)マウスを20ナノモルのPCLUS4-18で免疫し、それらの脾臓細胞を、組換えIL-2(rIL-2、10U/ml)の存在下もしくは非存在下においてPCLUS4-18もしくはP18単独で6日間再度刺激する前に、抗-CD4(RL174、参考文献113)および補足物で、もし

くはこれらなしで処理した。得られたイフェクター細胞を、標的としてのgp160-発現15-12BALB/c線維芽細胞株またはneoのみ形質導入した線維芽細胞(図示せず)について試験した(図9B)。neoのみ形質導入した対照標的については溶解は観察されなかった(4.2%未満)。3回繰り返したウェルのSEMは平均の7.3%未満であった。対照としての、IL-2の存在下における(P18に結合していない)PCLUS4単独は、いかなるCTL活性も誘発しなかった。P18単独ではないPCLUS4-18は、rIL-2の非存在下において、CTL活性の誘発を刺激して助力を置き換えた(図9B)。この結果は、PCLUS4-18ペプチドが、再刺激培養においてT細胞の助力を引き出すこと示唆した。これは、外部IL-2を不必要にする。CD4⁺細胞を排除することにより、IL-2の非存在下におけるCTL活性の誘発は妨げられるが、IL-2の存在下ではそのようなことはない(図9B)。このように、PCLUS4-18に対して免疫された細胞の培養物中に誘導され、PCLUS4-18で再度刺激されたヘルパー細胞は、CD4陽性であった。rIL-2の存在下、抗-CD4-処理細胞培養物中でのCTL活性の誘導は、この抗体および補足物での処理がCTL前駆体それ自体には影響を及ぼさないことを示している。したがって、CTL前駆体は、CTLイフェクター細胞(図9A)と同様に、CD4陰性である。

このように、我々は、CTLを誘発するためには、イン・ビボにおけるヘルパー-CTL決定基結合が必要であること

を示した。これは、CTLについては未だかつて示されたことはなく、イン・ビ

ポにおける同系助力が永年広く認められているTh-B細胞協力とは対照的である。この結果は、共有結合的な結合が強制されていない、ヘルパーとCTL抗原性ペプチドとの混合物を用いる最近の2つの研究(90、102)とは対照的であるように思われる。我々は、前者の研究(90)においては、アジュバントエマルジョン中のペプチドの隔離がそれらを一緒に微小油滴中に物理的に保護することを、そして後者の研究(102)においては、用いられるペプチドの多重高投与量が非結合混合物の本質的な不都合を解消し得ることを示唆することによって、これらの発見を一致させることができる。この説明は、イン・ビボにおいて拒絶応答を誘導するために同じ皮膚移植片上に存在するヘルパーおよびCTL決定基に対する要求(89)によって示される、同じ提示細胞上での近接もしくは提示に対する要求と一致する。この説明はまた、培養ウェルの境界において、クラスターペプチドとP18との混合物が、共有結合構築体にほぼ十分なIL-2を加えることなくCTL応答を引き出すに十分であるというイン・ビトロでの我々の発見に一致する。アジュバントエマルジョンを伴わない低い用量は、自然感染の事例をより密接に模倣し得る。最も強いCTL応答を誘発するペプチドは株の間で異なるので(図7A-7C)、化合物ペプチドによるCTL応答の増強は、イン・ビボにおける酵素的な分解に対するこのペプチドの耐性または感受性に及ぼすヘルパー部位の効果によっては簡単に説明すること

はできない。実際、クラスIIでは異なるが同じH-2D^dクラスI分子を共有する類遺伝子性組換えマウス系の間の異なるペプチド構築体に対する反応性の再現性のある差異は、ヘルパーT細胞がクラスII MHCに制限され、クラスターペプチドが全てのクラスII分子によって均等に与えられるものではないことを意味する。さもないと、クラスターペプチドを用いることにより、異なるMHC型のマウスの間で単一のヘルパー決定基によって引き出されるであろうものよりも広いヘルパー認識が可能となる(42)。

化合物ペプチドによるイン・ビボにおけるCTLの誘発機構は、より長いペプチドが、CTL誘発に関連付けられる特化したクラスII-発現抗原提示細胞(APC)(100、106、107)によって、恐らくは注入部位もしくは排液リ

ンパ節において、血清もしくは細胞外流体中でプロテアーゼによってペプチドが分解する前に取り込まれ、前記細胞がクラス I およびクラス II MHC によって CTL および Th エピトープの両者をそれぞれ提示するのであろう。この提示は、2 種類のエピトープが異なる APC によって独立に提示される他のものよりも効率的である。同じ APC によるより効率の高い提示は、それがヘルパー T 細胞と CTL 前駆体とを一緒に有し、少量の不安定なリンホカイン類をより効率的に送達するためであるか、あるいは、Gill および Lafferty (108) によって示唆されるように、APC がヘルパー細胞によって活性化し、その後順番に、CTL に対する提示抗原でより効力が高まるためであらう。前者の場合には、両細胞へ

の提示事象が時間的に近接するであらう。これに対して、後者の場合に時間的に離れてもよい。いずれの場合においても、同じ APC は 2 つの分離した APC よりも効率的であり、したがって、結合した決定基は、一度イン・ビボに注入されると離散し得るものよりも効率的である。これは、特化した APC 発現クラス II MHC が、それぞれ CTL および Th へのクラス I およびクラス II MHC 両経路によって細胞外抗原を同時に提示するという最近の観察 (107)、および前に引用した皮膚移植片実験 (89) と一致する。QS21 は、細胞膜を浸透し、細胞質に抗原を誘導する能力があってもよい。それは、この細胞質から MHC クラス I 提示経路に入ることができる (103)。上記機構のいずれが保持されていても、同じ APC による両細胞の刺激は助力の送達を容易にする。

HIV-1 感染の AIDS への進行は、HIV-1 特異サイトカイン応答における Th1 から Th2 優性へのシフトに相関するようである (109、110)。我々の研究所の以前の研究において、併発している吸血住虫感染による P18 に対する CTL 応答の減少が、IL2 を産生する Th1 から Th2 優性へとシフトすることに相関することが明らかであった (111)。Th1 細胞は、Th2 細胞が CTL 産生を阻害するサイトカイン類を分泌するのに対して、CD4⁺ クラス II に制限される、CTL 誘発の助力を提供するものと考えられている。したがって、HIV-1 キャリアを免疫療法のために免疫することは、これらの化合

物構築物が意図する

ように、Th1 CD4⁺細胞およびCTLの両者を追加免疫するのであれば、最も効率的である。

P18-特異的中和抗体を誘発するための助力もまた、4種類の異なる表現型のマウスをクラスターペプチドを含むこれらの化合物構築体(例I)で単一免疫した後に観察された。ここに提示される免疫実験は実験動物において行なわれたものであるが、同じエピトープが1以上の組織適合性複合体(HLA)クラスIIもしくはクラスI分子を有するヒトヘルパーT細胞およびCTLによっても認識されるという事実は、同じアプローチをヒトの免疫に適用することが可能であることを示唆している。クラスター3および4は北米および欧州のHIV-1個体の間で比較的保存されている配列を有しており、クラスター6は保存された配列と可変配列の間の境界をまたいでいる(43)。

クラスII MHC分子において相違する組換えマウスを用いる我々の現在の結果は、T-T協働およびCD4⁺クラスIIで制限されるイン・ビボにおけるCTL応答誘発の助力を容易にするために、Th決定基は単一ペプチド上のCTL決定基と共有結合的に結合すべきであることを示唆している。また、高力価のHIV-中和抗体を誘発することが既に示されている(上記例I)これらのクラスターペプチド-P18構築体は、多重MHC型の個人において、HIVに対する中和抗体の他にCTLを誘発する有用な免疫構築体である。

例III: HIV-1変異体MNのP18ペプチドに結合したクラスターペプチドによって誘発された広い免疫応答

HIV-1ウイルスのV3ループの超可変性は、この領域内の特定のアミノ酸配列を指向するワクチンは個人が晒されうる広範囲の種類の株に対する防御を与えはしないという問題を提示する。株の変異の問題を解消するためのアプローチの1つは、各々異なる株の標的病原を指向する幾つかのペプチドの混合物を含む調製品で個人を免疫することである。HIV-1のさらなる株に対するこの発明のペプチドの効率を評価するために、HIV-1のMN株のV3ループに由来す

る P 1 8 ペプチドに結合した、一連のクラスターペプチドを調製した。

これらのペプチドは、上記 General Methods に記述される通りに調製した。PCLUS-18MNペプチドは表 VIに提示されている（配列番号27-33）。

表 VI
PCLUS-18MN ペプチド

PCLUS1-18MN

EQMHEDIISLWDQSLKPCVKRIHIGPGRIFYTTKN

PCLUS3-18MN

KQIINMWQEVGKAMYAPPISGQIRRIHIGPGRIFYTTKN

PCLUS4-18MN

RDNWRSELYKYKVVKIEPLGVAPTRIHIGPGRIFYTTKN

PCLUS6-18MN

AVAEGTDRVIEVVQAYRAIRHIPRRIRQGLERRIHIGPGRIFYTTKN

PCLUS6.1-18MN

DRVIEVVQAYRAIRHIPRRIRQGLERRIHIGPGRIFYTTKN

P53-18MN

DRVIEVVQAYRAIRRIHIGPGRIFYTTKN

P55-18MN

AQGAYRAIRHIPRRIRRIHIGPGRIFYTTKN

⊙ P18MN 部 分 = RIHIGPGRIFYTTKN, 表1に示したPCLUS部分

4種類の異なる表現型を表わす4種類の系統のマウス（例I参照、表II）を、例Iに記述される通りに完全フロイントアジュバント（CFA）中に乳化したP18MN、PCLUS3-18MNもしくはPCLUS6-18MNペプチド20ナノモルを腹腔内投与して免疫した。7ないし8週間後、これらのマウスを第2の免疫、20ナノモルを再度腹腔内投与することで追加免疫し、HIV-1MN株に対するAbN力価を決定した。この実験の結果を図10に示す。

ペプチドPCLUS6-18MNおよびPCLUS6.1-18MNを比較する類似の実験において、これらのペプチドを用いる他は上述の通りにマウスを免

疫した。この実験の結果を図11A-11Hに示す。

これら2つの実験から、PCLUS3-18MN、PCLUS6-18およびPCLUS6.1-18MNは、PCLUS3-18MNがBALB/cマウスにおいては免疫応答を誘発しないことを除いて、試験した全ての系統のマウスにおいて、1:64を越える力価を有するAbNのレベルを誘発することが結論付けられる。このように、H-2^d表現型はPCLUS-18MNペプチドには応答しない。

PCLUS-18MNペプチドに対するCTL応答を、P18MNおよびPCLUS3-18MNペプチドを用いて調べた。以下のアジュバントの1種と1:1で乳化したペプチド20ナノモルを用いて、BALB/cマウスのグループの第1の免疫を行なった：ミョウバン、不完全フロイントアジュバント（IFA）、QS21（上記）、DOTAP（Boehringer

Mannheim Biochimica, カタログ番号1202 375；DOTAPは原形質膜を通して細胞内に巨大分子を導入するためのリポフェクション（lipofection）試薬である）およびC259/763（C259/763は、Lederle研究所のFredrick Durr博士によって提供された権利品である）。

2ないし3週間後にこれらのマウスを10ナノモルのペプチドで追加免疫し、さらに2ないし3週間後に、1グループ当たり2匹のマウスから脾臓を取り出し、上記例IIに記載される通りに、イン・ビトロで刺激した。6日後、これらの細胞を回収し、同じく例IIに記載されている通りに、通常の細胞毒性T細胞アッセイにおいて試験した。結果を図12A-12Bに示す。

PCLUS6-18MNペプチドのCTL応答を誘発する能力を評価するためにさらなる実験を行なった。PCLUS3-18MNに対するCTLを誘発させるために上で用いた免疫と類似の免疫を用いた。この第2の事例では、P18MNおよびPCLUS6-18MNおよびPCLUS6.1-18MNに対する応答を比較した。しかしながら、20ナノモルのペプチドを用いて追加免疫を行ない、ペプチドP18およびIL-2（後者は非特異的な助力を得るためのものである）を用いるイン・ビトロ刺激の後、CTLの量について脾臓細胞のアッセイ

を行なった。この実験の結果を図13A-13Bに示す。

CTL実験によって明瞭に示されるように、CTL応答の誘発において、PCLUS-18MNペプチドはP18MN

ペプチドよりも効率的である。CTL応答は、広い範囲の異なるMHC表現型を有するマウスにおいて生じる。さらに、CTL応答の生成におけるPCLUS-18MNペプチドのより優れた効率は、種々のアジュバント中において示し得る。

V3ループの超可変性がこの領域に特異的な中和抗体およびCTLを誘発することを目的とするワクチンを設計する上での問題を引き起こすとしても、欧州および北米において最も一般的な株の代表である(24、71)HIV-1MN単離体に由来するP18領域と同じ構成もまた、イン・ビボにおけるMN変異体に対するCTL応答を誘発し、中和抗体応答を引き出すことが見出されたことは励みになる。また、最近我々は、III_B-gp160誘発ネズミ脾臓を1つの位置に脂肪族置換があるMN型ペプチド(112)で再刺激することにより、ウイルス株に関して広い特異性を有するCTLポピュレーションが生成しうることを見出した。

上記の例によって示されるように、広い範囲のMHC表現型を示す宿主における中和抗体およびCTLの両者の誘発のための十分な結合した助力を引き出すこの発明によるペプチドは、AIDSの予防または免疫治療のためのワクチン候補として考慮されるべきである。ここに提示されたアプローチ、すなわち、中和抗体に対するThエピトープ、CTLエピトープおよびPNDを構成するエピトープを共有結合的に結合させ、広い範囲のMHC型を有する複数の宿主においてこれら全ての免疫応答の生起に効果的な単一の免疫原性ポリペプチドとすることは、他の病原に適用することが可能で

ある。特に、このアプローチが他のウイルス性病原、例えば、これらに限定されるものではないが、サイトメガロウイルス、肝炎ウイルス、HTLV-I、ラビーウイルス等に対するワクチンの開発に適用可能であることが期待される。さら

に、非ヒト宿主を持つウイルス、例えば、ネコ白血病ウイルス、ネコ免疫不全ウイルス等に対するワクチンもまた、この発明のアプローチを用いて生成することが可能である。

例IV：マラリアサーカスボロゾイト抗原に対する広い免疫応答の誘発

米国特許5,028,425には、熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) のサーカスボロゾイト (*circumsporozoite*; CS) タンパクを指向する合成ワクチンが開示されている。このワクチンは、CS抗原由来のCTLエピートープを含むペプチド免疫原からなる。米国特許4,886,782には、AbNに結合するThエピートープからなるCSタンパクに対する第2の合成ワクチンが開示されている。これらの特許は、各々、参照することによって全体がここに組み込まれる。

広い範囲のMHC型によって認識され、Th応答、CTL応答および高力価AbN応答を引き出すペプチドワクチンを作製するために、配列
PSDKKIEQYLKKIKNSISCNP (NANP), NAKPKDEL
DYENDIEKKICKMEKCS (配列番号35) を有するペプチドを上述の通りに合成する。このペプチドを、異なるMHC表現型 (B10.D2, B1

0A (5R) およびB10.S (9R) 系のマウスに、例IIに記載される通りに投与する。AbNおよびCTL応答を、例IおよびIIにそれぞれ記載される通りに評価する。

例V：ヒト患者における臨床試験

この発明によるペプチドは、予防もしくは治療ワクチンとしてヒト患者に投与することができる。最初に、安全性および最大耐量を評価するために、既にHIVに感染しているヒト患者において臨床試験を行なう。したがって、この例は、治療様式におけるワクチン形成の効率の予備的な証拠を提示する実験を記述する。

この発明によるペプチドは、当該分野において周知の材料および方法を用いて、医薬組成物に処方することができる。例えば、このペプチドは、無菌の薬学的に許容し得る担体溶液、例えば、生理食塩水、および注入可能な調製品を調製す

るためのシリンジボトルに封入されたものと混合することができる。

投与されるペプチドの投与量もまた、薬学分野において周知の方法によって決定することができる。投与される実際の投与量は、半減時間、種々の組織による隔離、投与経路等を含む様々な薬物動力学特性によって変化する。典型的には、ペプチド医薬は0.1ないし50 μ g/患者体重kgの範囲をとる量で投与される。

ここで記述される臨床試験において、実験群は、年齢18-75の、CD4⁺細胞カウントが>600細胞/mlであるHIV感染患者からなる。試験に入る患者は、再生抗原

(recall antigen)、例えば、参考文献57に記述されている、IL-2産生アッセイにおけるインフルエンザウイルス、に対する応答によって測定される、本来のT細胞免疫機能の証拠を提示すべきであるという要求が考慮される。患者は、試験の最初の4ヶ月間は、抗レトロウイルス治療から離れるべきである。試験に突入して3ヶ月目に入って、CD4⁺細胞カウントが500細胞/ml未満であり、それが1ヶ月間維持されるならば、標準抗レトロウイルス治療が患者に施される。

Seppic Inc. (Fairfield, NJ) によるGMP標準で調製された処方で、モンタナイド (Montanide) ISA-51アジュバント中に含まれるペプチドPCLUS3-18およびPCLUS6.1-18を患者に皮下投与する。第0日にワクチンを投与し、第1、3、6、9および12ヶ月目に追加免疫する。以下の免疫群を作製する：

1. 80 μ g PCLUS3-18
2. 80 μ g PCLUS6.1-18
3. 160 μ g PCLUS3-18
4. 160 μ g PCLUS6.1-18
5. 80 μ g PCLUS3-18+80 μ g PCLUS6.1-18
6. 160 μ g PCLUS3-18+160 μ g PCLUS6.1-18

患者を、最初に群1および2に、次いで群3および4に、その後群5に、最後に

群6に入れる。ペプチドのヒトへの投与に関して経験を得ることができるので、個々のペプチドの1種もしくは他のものの6ヶ月のレジメの後には、群1-4の

患者は、PCLUS3-18とPCLUS6.1-18との組み合わせを受けられたほうがよい。

個々の患者において、下記を含む種々の免疫系パラメータが監視される：

通常の化学的および血液学的パラメータ；

毒性学および日和見感染の試験；

リンパ球サブセット；

血清HIV p24抗原レベル；

ウイルス負荷の測定のために血清、血漿および細胞が定期的に凍結される；測定は、PCRをベースとするアッセイを含む、この技術分野の現状をなすアッセイによる；

ペプチドおよびHIV上の他の決定基に特異的な抗体の測定；

HIV中和抗体力価の決定；

マイトジェン、アロ抗原、通常の抗原（例えばインフルエンザ）およびHIV抗原に対する応答における、インターロイキン-2産生を含むサイトカイン産生；

HIV抗原に対するCTL活性の測定；

サイトカイン応答の試験に用いられるもの以外の抗原に対する免疫応答のための皮膚試験。

これらのアッセイの各々の技術は、当該技術分野においては日常的なものである。

。

例VI：診断アッセイにおけるこの発明のペプチドの使用

広範な免疫応答を引き出す免疫原としての有用性に加えて、この発明によるペプチドが診断様式で患者の抗体およびCT

L機能のアッセイにも利用可能であることは、当該分野の熟練者にはもちろん明らかである。

抗体アッセイ、とりわけELISA、RIA等の固相アッセイ、の基礎フォーマットは当該分野においては周知である。そのような固相アッセイにおいては、不溶性基板にこの発明によるペプチドを結合させ、このペプチドが結合している基板を、サンプル中に特異的な抗ペプチド抗体が存在する場合にはそれらがペプチドに結合し得るような条件下で、試験しようとするサンプルと接触させる。その後、当該分野において周知の種々の手段によって結合抗体を検出する。そのような検出方法の1つでは、例えば、IgGのFc領域に特異的な放射標識もしくは酵素標識二次抗体が用いられる。

同様に、CTL応答の測定も周知である。CTL応答を測定する一方法は例IIに記載されている。したがって、患者由来の末梢血細胞をこの発明によるペプチド、およびMHC分子を発現する線維芽細胞系（それらの表面にはこの発明によるペプチドが提示される）を含む標的細胞ポピュレーションと共にインキュベートすることができる。標的細胞のペプチド特異的な溶解が、患者におけるCTL機能の尺度である。

ここに記述された発明は、この発明の作製および実施に用いられる材料および方法の種々の変形を用い得ることは、当該分野の熟練者には明らかであろう。そのような変形は、以下に請求される発明の範囲に包含されるものと考えられる。

参考文献

この明細書を通して、多くの科学文献および特許刊行物を参照している。そのような文献は、参照することにより全体がここに組み込まれる。技術文献に見出すことができる文献を以下に列挙する：

1. Fauci, A. S., *Science* 239:617 (1988).
2. Lane, H. C., J. M. Depper, W. C. Greene, G. Whalen, T. A. Waldmann, and A. S. Fauci., *New Engl. J. Med.* 313:79 (1985).
3. Redfield, R. R., D. L. Birx, N. Ketter, E. Tramont, V. Polonis, C. Davis, J. F. Brundage, G. Smith, S. Johnson, A. Fowler, T. Wierzba, A. Shafferman, F. Volvovitz, C. Oster, and D. S. Burke, *N. Engl. J. Med.* 324:1677 (1991).
4. Schechter, M. T., K. J. P. Craib, T. N. Le, J. S. G. Montaner, B. Douglas, P. Sestak, B. Willoughby, and M. V. O'Shaughnessy, *AIDS* 4:185 (1990).

5. Dalgleish, A. G., S. Wilson, M. Gompels, C. Ludlam, B. Gazzard, A. M. Coates, and J. Habeshaw, *Lancet* 339:824 (1992).
6. Wendler, I., U. Bienzle, and G. Hunsmann, *AIDS Res. Hu. Retroviruses* 3:157 (1987).
7. Simmonds, P., D. Beaton, R. J. G. Cuthbert, H. Watson, B. Reynolds, J. F. Peutherer, J. V. Parry, C. A. Ludlam, and C. M. Steel, *Lancet* 338:1159 (1991).
8. Nara, P. L., R. R. Garritty, and J. Goudsmit, *FASEB J.* 5:2437 (1991).
9. Nara, P. L. and J. Goudsmit, "Clonal dominance of the neutralizing response to the HIV-1 V3 epitope: 'Evidence for "original antigenic sin" during vaccination and infection in animals, including humans." In *Vaccines 91*. R.M. Channock, H. Ginsberg, F. Brown and R.A. Lerner, eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, p. 37 (1991).
10. Kohler, H., J. Goudsmit, and P. Nara, *J. Acq. Immune Defic. Syndromes* 5: 1158 (1992).
11. Robinson, W. E., Jr., T. Kawamura, M. K. Gorny, D. Lake, J. -Y. Xu, Y. Matsumoto, T. Sugano, Y. Masuho, W. M. Mitchell, E. Hersh, and S. Zolla-Pazner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87:3185 (1990).
12. Habeshaw, J. A., A. G. Dalgleish, L. Bountiff, A. L. Newell, D. Wilks, L. C. Walker, and F. Manca, *Immunol. Today* 11:418 (1990).
13. Takeda, A., C. U. Tuazon, and F. A. Ennis, *Science* 242:580 (1988).

14. Robinson, W. E. Jr., D. C. Montefiori, and W. M. Mitchell, *Lancet* 1988:790 (1988).

15. Berman, P. W., T. J. Gregory, L. Riddle, G. R. Nakamura, M. A. Champe, J. P. Porter, F. M. Wurm, R. D. Hershberg, E. K. Cobb, and J. W. Eichberg, *Nature* 345:622 (1990).

16. Homsy, J., M. Meyer, M. Tateno, S. Clarkson, and J. A. Levy, *Science* 244:1357 (1989).

17. Weinhold, K. J., H. K. Lyerly, S. D. Stanley, A. A. Austin, T. J. Matthews, and D. P. Bolognesi, *J. Immunol.* 142:3091 (1989).

18. Siliciano, R. F., L. Trebor, C. Knall, R. W. Karr, P. Berman, T. Gregory, and E. L. Reinherz, *Cell* 54:561 (1988).

19. Golding, H., F. A. Robey, F. T. Gates, III, W. Linder, P. R. Beining, T. Hoffman, and B. Golding, *J. Exp. Med.* 167:914 (1988).

20. Golding, H., G. M. Shearer, K. Hillman, p. Lucas, J. Manischewitz, R. A. Zajac, M. Clerici, R. E. Gress, N. R. Boswell, and B. Golding, *J. Clin. Invest.* 83:1430 (1989).

21. Palker, T. J., M. E. Clark, A. J. Langlois, T. J. Matthews, K. J. Weinhold, R. R. Randall, D. P. Bolognesi, and B. F. Haynes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85:1932 (1988).

22. Rusche, J. R., K. Javaherian, C. McDanal, J. Petro, D. L. Lynn, R. Grimala, A. Langlois, R. C. Gallo, L. O. Arthur, P. J. Fischinger, D. P. Bolognesi, S. D. Putney, and T. J. Matthews, *Proc. Natl. Acad. Sci.*

U. S. A. 85:3198 (1988).

23. Goudsmit, J., C. Debouck, R. H. Melloen, L. Smit, M. Bakker, D. M. Asher, A. V. Wolff, C. J. Gibbs, Jr., and D. C. Gajdusek, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85:4478 (1988).

24. LaRosa, G. J., J. P. Davide, K. Weinhold, J. A. Waterbury, A. T. Profy, J. A. Lewis, A. J. Langlois, G. R. Dreesman, R. N. Boswell, P. Shadduck, L. H. Holley, M. Karplus, D. P. Bolognesi, T. J. Matthews, E. A. Emini, and S. D. Putney, *Science* 249:932 (1990).

25. Steimer, K. S., C. J. Scandella, P. V. Skiles, and N. L. Haigwood, *Science* 254:105 (1991).

26. Javaherian, K., A. J. Langlois, C. McDanal, K. L. Ross, L. I. Eckler, C. L. Jellis, A. T. Profy, J. R. Rusche, D. P. Bolognesi, S. D. Putney, and T. J. Matthews, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86:6768 (1989).

27. Gorny, M. K., A. J. Conley, S. Karwowska, A. Buchbinder, J. -Y. Xu, E. A. Emini, S. Koenig, and S. Zolla-Pazner, *J. Virol.* (1992)

28. Chanh, T. C., G. R. Dreesman, P. Kanda, G. P. Linette, J. T. Sparrow, D. D. Ho, and R. C. Kennedy, *EMBO. J.* 5:3065 (1986).

29. Warren, R. Q., H. Wolf, K. R. Shuler, J. W. Eichberg, R. A. Zajac, R. N. Boswell, P. Kanda, and R. C. Kennedy, *J. Virol.* 64:486 (1990).

30. Girard, M., M. -P. Kieny, A. Pinter, F. Barre-Sinoussi, P. Nara, H. Kolbe, K. Kusumi, A. Chaput, T. Reinhart, E. Muchmore, J. Ronco, M. Kaczorek, E. Gomard, J. -C. Gluckman, and P. N. Fultz, *Proc. Natl. Acad. Sci.*

U. S. A. 88:542 (1991).

31. Emini, E. A., P. L. Nara, W. A. Schleif, J. A. Lewis, J. P. Davide, D. R. Lee, J. Kessler, S. Conley, S. Matsushita, S. D. Putney, R. J. Garety, and J. W. Eichberg, *J. Virol.* 64:3674 (1990).

32. Emini, E. A., W. A. Schleif, J. H. Nunberg, A. J. Conley, Y. Eda, S. Tokiyoshi, S. D. Putney, S. Matsushita, K. E. Cobb, C. M. Jett, J. W. Eichberg, and K. K. Murthy, *Nature* 355:728 (1992).

33. Nara, P. L., L. Smit, N. Dunlop, W. Hatch, M. Merges, D. Waters, J. Kelliher, R. C. Gallo, P. J. Fischinger, and J. Goudsmit, *J. Virol.* 64:3779 (1990).

34. Albert, J., B. Abrahamsson, K. Nagy, E. Aurelius, H. Gaines, G. Nyström, and E. M. Fenyo, *AIDS* 4:107 (1990).

35. Reitz, M. S., Jr., C. Wilson, C. Naugle, R. C. Gallo, and M. Robert-Guroff, *Cell* 54:57 (1990).

36. Takahashi, H., S. Merli, S. D. Putney, R. Houghten, B. Moss, R. N. Germain, and J. A. Berzofsky, *Science* 246:118 (1989).

37. Takahashi, H., R. Houghten, S. D. Putney, D. H. Margulies, B. Moss, R. N. Germain, and J. A. Berzofsky, *J. Exp. Med.* 170:2023 (1989).

38. Saag, M. S., B. H. Hahn, J. Gibbons, Y. Li, E. S. Parks, W. P. Parks, and G. M. Shaw, *Nature* 334:440 (1988).

39. Fisher, A. G., E. Ensoli, D. Looney, A. Rose, R. C. Gallo, M. S. Saags, G. M. Shaw, B. H. Hahn, and F.

Wong-Staal, *Nature* 334:444 (1988).

40. Kusumi, K., B. Conway, S. Cunningham, A. Berson, C. Evans, A. K. N. Iversen, D. Colvin, M. V. Gallo, S. Coutre, E. G. Shpaer, D. V. Faulkner, A. DeRonde, S. Volkman, C. Williams, M. S. Hirsch, and J. I. Mullins, *J. Virol.* 66:875 (1992).

41. Boudet, F., M. Girard, J. Theze, and M. Zouali, *Internat. Immunol.* 4:283 (1992).

42. Berzofsky, J. A., C. D. Pendleton, M. Clerici, J. Ahlers, D. R. Lucey, S. D. Putney, and G. M. Shearer, *J. Clin. Invest.* 88:876 (1991).

43. Myers, G., S. F. Josephs, J. A. Berzofsky, A. B. Rabson, T. F. Smith, and F. Wong-Staal, *Human retroviruses and AIDS 1989*, Los Alamos National Laboratory, New Mexico (1989).

44. Ratner, L., W. Haseltine, R. Patarca, K. J. Livak, B. Starcich, S. F. Josephs, E. R. Doran, J. A. Rafalski, E. A. Whitehorn, K. Baumeister, L. Ivanoff, S. R. Petteway, Jr., M. L. Pearson, J. A. Lautenberger, T. S. Papas, J. Ghrayeb, N. T. Chang, R. C. Gallo, and F. Wong-Staal, *Nature* 313:277 (1985).

45. Takahashi, H., J. Cohen, A. Hosmalin, K. B. Cease, R. Houghten, J. Cornette, C. DeLisi, B. Moss, R. N. Germain, and J. A. Berzofsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:3105 (1988).

46. Clerici, M., D. R. Lucey, R. A. Zajac, R. N. Boswell, H. M. Gebel, H. Takahashi, J. Berzofsky, and G. M. Shearer, *J. Immunol.* 146:2214 (1991).

47. Golvano, J., J. J. Lasarte, P. Sarobe, A. Gullón.

J. Prieto, and F. Borrás-Cuesta, *Eur. J. Immunol.* 20:2363 (1990).

48. Tindle, R. W., G. J. P. Fernando, J. C. Sterling, and I. H. Frazer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5887 (1991).

49. Cox, J. H., J. Ivanyi, D. B. Young, J. R. Lamb, A. D. Syred, and M. J. Francis, *Eur. J. Immunol.* 18:2015 (1988).

50. Berzofsky, J. A., *FASEB J.* 5:2412 (1991).

51. Stewart, J. M. and J. D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*. Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois (1984).

52. Nara, P. L., W. C. Hatch, N. M. Dunlop, W. G. Robey, L. O. Arthur, M. A. Gonda, and P. J. Fischinger, *AIDS Res. Hu. Retroviruses* 3:283 (1987).

53. Hosoi, S., T. Borsos, N. Dunlop, and P. L. Nara, *J. Acq. Immune Defic. Syndromes* 3:366 (1990).

54. Hale, P. M., K. B. Cease, R. A. Houghten, C. Ouyang, S. Putney, K. Javaherian, H. Margalit, J. L. Cornette, J. L. Spouge, C. DeLisi, and J. A. Berzofsky, *Internat. Immunol.* 1:409 (1989).

55. Cease, K. B., H. Margalit, J. L. Cornette, S. D. Putney, W. G. Robey, C. Ouyang, H. Z. Streicher, P. J. Fischinger, R. C. Gallo, C. DeLisi, and J. A. Berzofsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:4249 (1987).

56. Berzofsky, J. A., A. Bensussan, K. B. Cease, J. F. Bourge, R. Cheynier, Z. Lurhuma, J. -J. Salaün, R. C. Gallo, G. M. Shearer, and D. Zagury, *Nature* 334:706

(1988).

57. Clerici, M., N. I. Stocks, R. A. Zajac, R. N. Boswell, D. C. Bernstein, D. L. Mann, G. M. Shearer, and J. A. Berzofsky, *Nature* 339:383 (1989).

58. Plata, F., G. Dadaglio, N. Chenciner, A. Hoffenbach, S. Wain-Hobson, F. Michel, and P. Langlade-Demoyen, *Immunodeficiency Reviews* 1:227 (1989).

59. Devash, Y., J. R. Rusche, and P. L. Nara, *Biotech. Therap.* 2:49 (1991).

60. Chandrasekhar, K., A. T. Profy, and H. J. Dyson, *Biochem* 30:9187 (1991).

61. Javaherian, K., A. J. Langlois, G. J. LaRosa, A. T. Profy, D. P. Bolognesi, W. C. Herlihy, S. D. Putney, and T. J. Matthews, *Science* 250:1590 (1990).

62. Palker, T. J., T. J. Matthews, A. Langlois, M. E. Tanner, M. E. Martin, R. M. Searce, J. E. Kim, J. A. Berzofsky, D. P. Bolognesi, and B. F. Haynes, *J. Immunol.* 142:3612 (1989).

63. Hart, M. K., T. J. Palker, T. J. Matthews, A. J. Langlois, N. W. Lerche, M. E. Martin, R. M. Searce, C. McDanal, D. P. Bolognesi, and B. F. Haynes, *J. Immunol.* 145:2677 (1990).

64. Profy, A. T., P. A. Salinas, L. I. Eckler, N. M. Dunlop, P. L. Nara, and S. D. Putney, *J. Immunol.* 144:4641 (1990).

65. Broliden, P. -A., A. Von Gegerfelt, P. Clapham, J. Rosen, E. -M. Fenyö, B. Wahren, and K. Broliden, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:461 (1992).

66. Fung, M. S. C., C. R. Y. Sun, W. L. Gordon, R. S. Liou, T. W. Chang, W. N. C. Sun, E. S. Daar, and D. D. Ho, *J. Virol.* 66:848 (1992).

67. Berkower, I., D. Murphy, C. C. Smith, and G. E. Smith, *J. Virol.* 65:5983 (1991).

68. Nara, P. L., In *Retroviruses of Human AIDS and Related Animal Diseases*. M. Girard and L. Valette, eds. Pasteur Vaccines, Paris, p. 138 (1988).

69. Nara, P. L., In *Vaccines 89*. R. Lerner, H. Ginsberg, R.M. Channock and F. Brown, eds. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, p. 137 (1989).

70. Devash, Y., T. J. Matthews, J. E. Drummond, K. Javaherian, D. J. Waters, L. O. Arthur, W. A. Blattner, and J. R. Rusche, *AIDS Res. Hu. Retroviruses* 6:307 (1990).

71. Zwart, G., J. J. De Jong, T. Wolfs, L. Van Der Hoek, L. Smit, A. De Ronde, M. Tersmette, P. Nara, and J. Goudsmit, *Lancet* 335:474 (1990).

72. Nara, P., L. Smit, N. Dunlop, W. Hatch, M. Merges, D. Waters, J. Kelliher, W. Krone, and J. Goudsmit, *Develop. biol. Standard.* 72:315 (1990).

73. Ben-Sasson, S. Z., M. F. Lipscomb, T. F. Tucker, and J. W. Uhr, *J. Immunol.* 119:1493 (1977).

74. Ellner, J. J., P. E. Lipsky, and A. S. Rosenthal, *J. Immunol.* 118:2053 (1977).

75. Glimcher, L. H., J. A. Schroer, C. Chan, and E. M. Shevach, *J. Immunol.* 131:2868 (1983).

76. Shimonkevitz, R., S. Colon, J. W. Kappler, P. Marrack, and H. Grey, *J. Immunol.* 133:2067 (1984).

77. Corradin, G. P., M. A. Juillerat, and H. D. Engers, *J. Immunol.* 133:2915 (1984).

78. Lamb, J. R., E. D. Zanders, P. Lake, R. G. Webster, D. D. Eckels, J. N. Woody, N. Green, R. A. Lerner, and M. Feldmann, *Eur. J. Immunol.* 14:153 (1984).

79. Robinson, W. E. Jr., D. C. Montefiori, W. M. Mitchell, A. M. Prince, H. J. Alter, G. R. Dreesman, and J. W. Eichberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86:4710 (1989).

80. Cease, K. B., W. S. Probert, L. M. Groeneveld, N. M. Dunlop, and P. L. Nara, In *Vaccines92*. F. Brown, R.M. Chanock, H.S. Ginsberg and R.A. Lerner, eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, p. 201 (1992).

81. R. M. Zinkernagel, P. C. Doherty, *Adv. Immunol.* 27:51 (1979).

82. H. Wagner, A. Starzinski-Powitz, K. Pfizenmaier, M. Rollinghoff, *Nature* 263:235 (1976).

83. R. M. Zinkernagel, G. N. Callahan, A. Althage, S. Cooper, J. W. Streilein, et al, *J. Exp. Med.* 147:897 (1978).

84. H. Von Boehmer, W. Haas, *J. Exp. Med.* 150:1134 (1979).

85. C. J. Melief, M. Y. van der Meulen, B. J. Christiaans, P. de Greeve, *Eur. J. Immunol.* 9:7 (1979).

86. J. A. Keene, J. Forman, *J. Exp. Med.* 155:768 (1982).
87. W. M. Kast, A. M. Bronkhorst, L. P. De Waal, C. J. M. Melief, *J. Exp. Med.* 164:723 (1986).
88. L. A. Husmann, M. J. Bevan, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 532:158 (1988).
89. A. S. Rosenberg, A. Singer, *Ann. Rev. Immunol.* 10:333 (1992).
90. C. Widmann, P. Romero, J. L. Maryanski, G. Corradin, D. Valmori, *J. Immunol. Methods* 155:95 (1992).
91. M. B. Widmer, F. H. Bach, *Nature* 294:750 (1981).
92. H. Von Boehmer, K. Turton, *Eur. J. Immunol.* 13:176 (1983).
93. H. Von Boehmer, P. Kisielow, W. Leiserson, W. Haas, *J. Immunol.* 133:59 (1984).
94. J. Sprent, M. Schaefer, *J. Exp. Med.* 162:2068 (1985).
95. R. M. L. Buller, K. L. Holmes, A. Hügin, T. N. Frederickson, H. C. III Morse, *Nature* 328:77 (1987).
96. K. Deres, H. Schild, K. H. Wiesmüller, G. Jung, H. G. Rammensee, *Nature* 342:561 (1989).
97. P. Aichele, H. Hengartner, R. M. Zinkernagel, M. Schulz, *J. Exp. Med.* 171:1815 (1990).
98. W. K. Kast, L. Roux, J. Curren, H. J. J. Blom, A. C. Voordouw, et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2283

(1991).

99. M. Schulz, R. M. Zinkernagel, H. Hengartner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88:991 (1991).

100. H. Takahashi, Y. Nakagawa, M. Takeuchi, K. Yokomuro, J. A. Berzofsky, in *Vaccines 93*, F. Brown, R. M. Chanock, H. S. Ginsberg and R. A. Lerner, Eds. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1993).

101. M. K. Hart, K. J. Wainhold, R. M. Searce, E. M. Washburn, C. A. Clark, et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9448 (1991).

102. J. J. Lasarte, P. Sarobe, A. Gullón, J. Prieto, F. Borrás-Cuesta, *Cellular Immunol.* 141:211 (1992).

103. J. -Y. Wu, B. H. Gardner, C. I. Murphy, J. R. Seals, C. R. Kensil, et al, *J. Immunol.* 148:1519 (1992).

104. M. Shirai, C. D. Pendleton, J. A. Berzofsky, *J. Immunol.* 148:1657 (1992).

105. H. Takahashi, R. N. Germain, B. Moss, J. A. Berzofsky, *J. Exp. Med.* 171:571 (1990).

106. F. R. Carbone, M. J. Bevan, *J. Exp. Med.* 171:377 (1990).

107. K. L. Rock, S. Gamble, L. Rothstein, *Science* 249:918 (1990).

108. R. G. Gill, K. J. Lafferty, *J. Immunol.* 143:4009 (1989).

109. G. M. Shearer, M. Clerici, *Prog. Chem. Immunol.*

54, (1992).

110. M. Clerici, F. T. Hakim, D. J. Venzon, S. Blatt, C. W. Hendrix, et al, *J. Clin. Invest.* 91:759 (1993).

111. J. K. D Actor, M. Shirai, M. C. Kullberg, R. M. L. Buller, A. Sher, et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90:948 (1993).

112. H. Takahashi, Y. Nakagawa, C. D. Pendleton, R. A. Houghten, K. Yokomuro, et al, *Science* 255:333 (1992).

113. R. Ceredig, J. W. Lowenthal, M. Nabholz, H. R. MacDonald, *Nature* 314:98 (1985).

114. M. Sarmiento, A.L. Glasebrook, and F.W. Fitch, *J. Immunol.* 125:2665 (1980).

配 列 表

(1) 一般的情報

(i) 出願人:

(A) 名称: 保険社会福祉省/合衆国国立衛生研究所により代表される
合衆国政府

(B) 通り: ボックス OTT

(C) 市: ベセスダ

(D) 州: メリーランド

(E) 国: アメリカ合衆国

(F) 郵便番号: 20892

(ii) 発明の名称: HIVに対する中和抗体および細胞傷害性Tリンパ球を誘発する
複合合成ペプチド構築物

(iii) 配列の数: 36

(iv) 郵便あて先:

(A) あて名: バーチ、スチュワート、コラッシュ & バーチ

(B) 通り: P. O. ボックス 747

(C) 市: フォールズチャーチ

(D) 州: バージニア

(E) 国: USA

(F) 郵便番号: 22040-0747

(v) コンピュータ読取り可能な形態:

(A) 媒体タイプ: フロッピーディスク

(B) コンピュータ: IBM PC コンパチブル

(C) オペレーティングシステム: PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア: Patent In リリース#1.0, バージョン
#1.25

(vi) 現在の出願データ:

(A) 出願番号: US 08/060,988

(B) 出願日: 14-MAY-1993

(C) 特許分類:

(viii) 弁護士/弁理士 情報:

(A) 名称: スヴェンソン, レナード R.

(B) 登録番号: 30330

(C) 照会/事件 番号: 1173-434P

(ix) 電話連絡情報:

(A) 電話番号: 703-205-8000

(B) ファックス番号: 703-205-8050

(2) 配列番号1のための情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ: 35アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: リニア

(ii) 分子の型: ペプチド

(iii) 仮定: なし

(v) 断片の型: インターナル

(ix) 指標:

(A) 名称/標識配列: ペプチド

(B) 位置: 1 35

(D) その他の情報: /ラベル=ペプチド

／ノート = "p c l u s 1-18 / p 18 I I I B ペプチド、
表1参照"

(ii) 配列の記載：配列番号1：

```

Glu Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp Asp Gln Ser Leu Lys
1           5           10           15
Pro Cys Val Lys Arg Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe Val Thr
          20           25           30
Ile Gly Lys
          35

```

(2) 配列番号2のための情報：

- (i) 配列特性：
 - (A) 長さ：39アミノ酸
 - (B) 型：アミノ酸
 - (D) トポロジー：リニア
- (ii) 分子の型：ペプチド
- (v) 断片の型：インターナル
- (ix) 指標：
 - (A) 名称／標識配列：ペプチド
 - (B) 位置：1 39
 - (D) その他の情報：／ラベル=ペプチド
／ノート = "p c l u s 3-18 / p 18 I I I B ペプチド、
表1参照"

(ii) 配列の記載：配列番号2：

```

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala
1           5           10           15
Pro Pro Ile Ser Gly Gln Ile Arg Arg Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg
          20           25           30
Ala Phe Val Thr Ile Gly Lys
          35

```

(2) 配列番号3のための情報：

- (i) 配列特性：
 - (A) 長さ：39アミノ酸
 - (B) 型：アミノ酸
 - (D) トポロジー：リニア
- (ii) 分子の型：ペプチド
- (v) 断片の型：インターナル
- (ix) 指標：
 - (A) 名称／標識配列：ペプチド
 - (B) 位置：1 39
 - (D) その他の情報：／ラベル=ペプチド
／ノート = "p c l u s 4-18 / p 18 I I I B ペプチド、

表1参照

(ii) 配列の記載：配列番号3：

```

Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile
1           5           10           15
Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Arg Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg
20           25           30
Ala Phe Val Thr Ile Gly Lys
35

```

(2) 配列番号4のための情報：

- (i) 配列特性：
 - (A) 長さ：48アミノ酸
 - (B) 型：アミノ酸
 - (D) トポロジー：リニア
- (ii) 分子の型：ペプチド
- (v) 断片の型：インターナル
- (ix) 指標：
 - (A) 名称／標識配列：ペプチド
 - (B) 位置：1 48
 - (D) その他の情報：／ラベル=ペプチド
／ノート= "pclus 6-18/p18IIIBペプチド、
表1参照"

(ii) 配列の記載：配列番号4：

```

Ala Val Ala Glu Gly Thr Asp Arg Val Ile Glu Val Val Gln Gly Ala
1           5           10           15
Tyr Arg Ala Ile Arg His Ile Pro Arg Arg Ile Arg Gln Gly Leu Glu
20           25           30
Arg Arg Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe Val Thr Ile Gly Lys
35           40           45

```

(2) 配列番号5のための情報：

- (i) 配列特性：
 - (A) 長さ：30アミノ酸
 - (B) 型：アミノ酸
 - (D) トポロジー：リニア
- (ii) 分子の型：ペプチド
- (v) 断片の型：インターナル
- (ix) 指標：
 - (A) 名称／標識配列：ペプチド
 - (B) 位置：1 30
 - (D) その他の情報：／ラベル=ペプチド
／ノート= "p53/p18IIIBペプチド、表1参照"

(xi) 配列の記載：配列番号5：

Asp Arg Val Ile Glu Val Val Gln Gly Ala Tyr Arg Ala Ile Arg Arg
 1 5 10 15

Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe Val Thr Ile Gly Lys
 20 25 30

(2) 配列番号6のための情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ: 31 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: リニア

(ii) 分子の型: ペプチド

(v) 断片の型: インターナル

(ix) 指標:

(A) 名称/標識配列: ペプチド

(B) 位置: 1 31

(D) その他の情報: /ラベル=ペプチド

/ノート= "p 55 / p 18 I I I B ペプチド、表 1 参照"

(xi) 配列の記載: 配列番号6:

Ala Gln Gly Ala Tyr Arg Ala Ile Arg His Ile Pro Arg Arg Ile Arg
 1 5 10 15

Arg Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe Val Thr Ile Gly Lys
 20 25 30

(2) 配列番号7のための情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ: 15 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: リニア

(ii) 分子の型: ペプチド

(v) 断片の型: インターナル

(ix) 指標:

(A) 名称/標識配列: ペプチド

(B) 位置: 1 15

(D) その他の情報: /ラベル=ペプチド

/ノート= "p 18 I I I B ペプチド、表 V 参照"

(xi) 配列の記載: 配列番号7:

Arg Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe Val Thr Ile Gly Lys
 1 5 10 15

(2) 配列番号8のための情報:

(i) 配列特性:

- (A) 長さ: 13 アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (D) トポロジー: リニア
- (ii) 分子の型: ペプチド
- (v) 断片の型: インターナル
- (ix) 指標:
 - (A) 名称/標識配列: ペプチド
 - (B) 位置: 1 13
 - (D) その他の情報: /ラベル=ペプチド
/ノート="18RFペプチド; HIVのRF株における
p18IIIBに相同なペプチド、表V参照"
- (xi) 配列の記載: 配列番号8:

Thr Lys Gly Pro Gly Arg Val Ile Tyr Ala Thr Gly Gln
1 5 10

(2) 配列番号9のための情報:

- (i) 配列特性:
 - (A) 長さ: 14 アミノ酸
 - (B) 型: アミノ酸
 - (D) トポロジー: リニア
- (ii) 分子の型: ペプチド
- (v) 断片の型: インターナル
- (ix) 指標:
 - (A) 名称/標識配列: ペプチド
 - (B) 位置: 1 14
 - (D) その他の情報: /ラベル=ペプチド
/ノート="p18-1、表V参照"
- (xi) 配列の記載: 配列番号9:

Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe Val Thr Ile Gly Lys
1 5 10

(2) 配列番号10のための情報:

- (i) 配列特性:
 - (A) 長さ: 14 アミノ酸
 - (B) 型: アミノ酸
 - (D) トポロジー: リニア
- (ii) 分子の型: ペプチド
- (v) 断片の型: インターナル
- (ix) 指標:
 - (A) 名称/標識配列: ペプチド
 - (B) 位置: 1 14
 - (D) その他の情報: /ラベル=ペプチド
/ノート="p18-2、表V参照"
- (xi) 配列の記載: 配列番号10:

Arg Gln Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe Val Thr Ile Gly Lys
1 5 10

(2) 配列番号11のための情報:

- (i) 配列特性:
 - (A) 長さ: 15 アミノ酸
 - (B) 型: アミノ酸
 - (D) トポロジー: リニア
- (ii) 分子の型: ペプチド
- (v) 断片の型: インターナル
- (ix) 指標:
 - (A) 名称/標識配列: ペプチド
 - (B) 位置: 1 15
 - (D) その他の情報: /ラベル=ペプチド
/ノート="p18-3、表V参照"
- (xi) 配列の記載: 配列番号11:

Arg Ile Thr Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe Val Thr Ile Gly Lys
 1 5 10 15

(2) 配列番号12のための情報:

- (i) 配列特性:
 - (A) 長さ: 15 アミノ酸
 - (B) 型: アミノ酸
 - (D) トポロジー: リニア
- (ii) 分子の型: ペプチド
- (v) 断片の型: インターナル
- (ix) 指標:
 - (A) 名称/標識配列: ペプチド
 - (B) 位置: 1 15
 - (D) その他の情報: /ラベル=ペプチド
/ノート="p18-4、表V参照"
- (xi) 配列の記載: 配列番号12:

Arg Ile Gln Lys Gly Pro Gly Arg Ala Phe Val Thr Ile Gly Lys
 1 5 10 15

(2) 配列番号13のための情報:

- (i) 配列特性:
 - (A) 長さ: 15 アミノ酸
 - (B) 型: アミノ酸
 - (D) トポロジー: リニア
- (ii) 分子の型: ペプチド
- (v) 断片の型: インターナル
- (ix) 指標:
 - (A) 名称/標識配列: ペプチド
 - (B) 位置: 1 15
 - (D) その他の情報: /ラベル=ペプチド
/ノート="p18-5、表V参照"

(xi) 配列の記載：配列番号13：

Arg Ile Gln Arg Ala Pro Gly Arg Ala Phe Val Thr Ile Gly Lys
 1 5 10 15

(2) 配列番号14のための情報：

- (i) 配列特性：
 - (A) 長さ：15アミノ酸
 - (B) 型：アミノ酸
 - (D) トポロジー：リニア
- (ii) 分子の型：ペプチド
- (v) 断片の型：インターナル
- (ix) 指標：
 - (A) 名称／標識配列：ペプチド
 - (B) 位置：1 15
 - (D) その他の情報：／ラベル=ペプチド
／ノート="p18-6、表V参照"
- (xi) 配列の記載：配列番号14：

Arg Ile Gln Arg Gly Ala Gly Arg Ala Phe Val Thr Ile Gly Lys
 1 5 10 15

(2) 配列番号15のための情報：

- (i) 配列特性：
 - (A) 長さ：15アミノ酸
 - (B) 型：アミノ酸
 - (D) トポロジー：リニア
- (ii) 分子の型：ペプチド
- (v) 断片の型：インターナル
- (ix) 指標：
 - (A) 名称／標識配列：ペプチド
 - (B) 位置：1 15
 - (D) その他の情報：／ラベル=ペプチド
／ノート="p18-7、表V参照"
- (xi) 配列の記載：配列番号15：

Arg Ile Gln Arg Gly Pro Ala Arg Ala Phe Val Thr Ile Gly Lys
 1 5 10 15

(2) 配列番号16のための情報:

- (i) 配列特性:
 - (A) 長さ: 15 アミノ酸
 - (B) 型: アミノ酸
 - (D) トポロジー: リニア
- (ii) 分子の型: ペプチド
- (v) 断片の型: インターナル
- (ix) 指標:
 - (A) 名称/標識配列: ペプチド
 - (B) 位置: 1 15
 - (D) その他の情報: /ラベル=ペプチド
/ノート="p18-8、表V参照"
- (xi) 配列の記載: 配列番号16:

Arg Ile Gln Arg Gly Pro Gly Ala Ala Phe Val Thr Ile Gly Lys
 1 5 10 15

(2) 配列番号17のための情報:

- (i) 配列特性:
 - (A) 長さ: 15 アミノ酸
 - (B) 型: アミノ酸
 - (D) トポロジー: リニア
- (ii) 分子の型: ペプチド
- (v) 断片の型: インターナル
- (ix) 指標:
 - (A) 名称/標識配列: ペプチド
 - (B) 位置: 1 15
 - (D) その他の情報: /ラベル=ペプチド
/ノート="p18-9、表V参照"
- (xi) 配列の記載: 配列番号17:

Arg Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg Val Phe Val Thr Ile Gly Lys
 1 5 10 15

(2) 配列番号18のための情報:

- (i) 配列特性:
 - (A) 長さ: 15 アミノ酸
 - (B) 型: アミノ酸
 - (D) トポロジー: リニア
- (ii) 分子の型: ペプチド
- (v) 断片の型: インターナル
- (ix) 指標:
 - (A) 名称/標識配列: ペプチド
 - (B) 位置: 1 15
 - (D) その他の情報: /ラベル=ペプチド
/ノート="p18-10、表V参照"
- (xi) 配列の記載: 配列番号18:

Arg Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg Ala Ile Val Thr Ile Gly Lys
 1 5 10 15

(2) 配列番号19のための情報:

- (i) 配列特性:
 - (A) 長さ: 15 アミノ酸
 - (B) 型: アミノ酸
 - (D) トポロジー: リニア
- (ii) 分子の型: ペプチド
- (v) 断片の型: インターナル
- (ix) 指標:
 - (A) 名称/標識配列: ペプチド
 - (B) 位置: 1 15
 - (D) その他の情報: /ラベル=ペプチド
/ノート="p18-11、表V参照"
- (xi) 配列の記載: 配列番号19:

Arg Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Ile Gly Lys
 1 5 10 15

(2) 配列番号20のための情報:

- (i) 配列特性:
 - (A) 長さ: 15 アミノ酸
 - (B) 型: アミノ酸
 - (D) トポロジー: リニア
- (ii) 分子の型: ペプチド
- (v) 断片の型: インターナル
- (ix) 指標:
 - (A) 名称/標識配列: ペプチド
 - (B) 位置: 1 15
 - (D) その他の情報: /ラベル=ペプチド
/ノート="p18-12、表V参照"
- (xi) 配列の記載: 配列番号20:

Arg Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe Val Ala Ile Gly Lys
 1 5 10 15

(2) 配列番号21のための情報:

- (i) 配列特性:
 - (A) 長さ: 15 アミノ酸
 - (B) 型: アミノ酸
 - (D) トポロジー: リニア
- (ii) 分子の型: ペプチド
- (v) 断片の型: インターナル
- (ix) 指標:
 - (A) 名称/標識配列: ペプチド
 - (B) 位置: 1 . . 15

- (D) その他の情報: /ラベル=ペプチド
 /ノート= "p 18-13、表V参照"
 (xi) 配列の記載: 配列番号21:

Arg Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe Val Thr Thr Gly Lys
 1 5 10 15

(2) 配列番号22のための情報:

- (i) 配列特性:
 (A) 長さ: 15アミノ酸
 (B) 型: アミノ酸
 (D) トポロジー: リニア
 (ii) 分子の型: ペプチド
 (v) 断片の型: インターナル
 (ix) 指標:
 (A) 名称/標識配列: ペプチド
 (B) 位置: 1 15
 (D) その他の情報: /ラベル=ペプチド
 /ノート= "p 18-14、表V参照"
 (xi) 配列の記載: 配列番号22:

Arg Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe Val Thr Ile Ala Lys
 1 5 10 15

(2) 配列番号23のための情報:

- (i) 配列特性:
 (A) 長さ: 15アミノ酸
 (B) 型: アミノ酸
 (D) トポロジー: リニア
 (ii) 分子の型: ペプチド
 (v) 断片の型: インターナル
 (ix) 指標:
 (A) 名称/標識配列: ペプチド
 (B) 位置: 1 15
 (D) その他の情報: /ラベル=ペプチド
 /ノート= "p 18-15、表V参照"
 (xi) 配列の記載: 配列番号23:

Arg Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe Val Thr Ile Gly Gln
 1 5 10 15

(2) 配列番号24のための情報:

- (i) 配列特性:
 (A) 長さ: 24アミノ酸
 (B) 型: アミノ酸
 (D) トポロジー: リニア
 (ii) 分子の型: ペプチド
 (v) 断片の型: インターナル

- (ix) 指標:
 (A) 名称/標識配列: ペプチド
 (B) 位置: 1 24
 (D) その他の情報: /ラベル=ペプチド
 /ノート= "p c l u s 3 ペプチド"
 (xi) 配列の記載: 配列番号24:

```

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala
1          5          10          15
Pro Pro Ile Ser Gly Gln Ile Arg
                20

```

(2) 配列番号25のための情報:

- (i) 配列特性:
 (A) 長さ: 25アミノ酸
 (B) 型: アミノ酸
 (D) トポロジー: リニア
 (ii) 分子の型: ペプチド
 (v) 断片の型: インターナル
 (ix) 指標:
 (A) 名称/標識配列: ペプチド
 (B) 位置: 1 25
 (D) その他の情報: /ラベル=ペプチド
 /ノート= "p c l u s 4 ペプチド"
 (xi) 配列の記載: 配列番号25:

```

Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile
1          5          10          15
Glu Pro Leu Gly Gly Val Ala Pro Thr
                20          25

```

(2) 配列番号26のための情報:

- (i) 配列特性:
 (A) 長さ: 33アミノ酸
 (B) 型: アミノ酸
 (D) トポロジー: リニア
 (ii) 分子の型: ペプチド
 (v) 断片の型: インターナル
 (ix) 指標:
 (A) 名称/標識配列: ペプチド
 (B) 位置: 1 33
 (D) その他の情報: /ラベル=ペプチド
 /ノート= "p c l u s 6 ペプチド"
 (xi) 配列の記載: 配列番号26:

Ala Val Ala Glu Gly Thr Asp Arg Val Ile Glu Val Val Gln Gly Ala
 1 5 10 15
 Tyr Arg Ala Ile Arg His Ile Pro Arg Arg Ile Arg Gln Gly Leu Glu
 20 25 30
 Arg

(2) 配列番号27のための情報:

- (i) 配列特性:
 - (A) 長さ: 35アミノ酸
 - (B) 型: アミノ酸
 - (D) トポロジー: リニア
- (ii) 分子の型: ペプチド
- (v) 断片の型: インターナル
- (ix) 指標:
 - (A) 名称/標識配列: ペプチド
 - (B) 位置: 1 35
 - (D) その他の情報: /ラベル=ペプチド
 /ノート= "p c l u s 1 - 1 8 M N ペプチド"
- (xi) 配列の記載: 配列番号27:

Glu Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp Asp Gln Ser Leu Lys
 1 5 10 15
 Pro Cys Val Lys Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr
 20 25 30
 Thr Lys Asn
 35

(2) 配列番号28のための情報:

- (i) 配列特性:
 - (A) 長さ: 39アミノ酸
 - (B) 型: アミノ酸
 - (D) トポロジー: リニア
- (ii) 分子の型: ペプチド
- (v) 断片の型: インターナル
- (ix) 指標:
 - (A) 名称/標識配列: ペプチド
 - (B) 位置: 1 39
 - (D) その他の情報: /ラベル=ペプチド
 /ノート= "p c l u s 3 - 1 8 M N ペプチド、表V I 参照"
- (xi) 配列の記載: 配列番号28:

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala
 1 5 10 15
 Pro Pro Ile Ser Gly Gln Ile Arg Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg
 20 25 30
 Ala Phe Tyr Thr Thr Lys Asn
 35

(2) 配列番号29のための情報:

- (i) 配列特性:
 - (A) 長さ: 39アミノ酸
 - (B) 型: アミノ酸
 - (D) トポロジー: リニア
- (ii) 分子の型: ペプチド
- (v) 断片の型: インターナル
- (ix) 指標:
 - (A) 名称/標識配列: ペプチド
 - (B) 位置: 1 39
 - (D) その他の情報: /ラベル=ペプチド
 /ノート="pc l u s 4-1 SMNペプチド、表V I 参照"
- (ii) 配列の記載: 配列番号29:

Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile
 1 5 10 15
 Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg
 20 25 30
 Ala Phe Tyr Thr Thr Lys Asn
 35

(2) 配列番号30のための情報:

- (i) 配列特性:
 - (A) 長さ: 48アミノ酸
 - (B) 型: アミノ酸
 - (D) トポロジー: リニア
- (ii) 分子の型: ペプチド
- (v) 断片の型: インターナル
- (ix) 指標:
 - (A) 名称/標識配列: ペプチド
 - (B) 位置: 1 48
 - (D) その他の情報: /ラベル=ペプチド
 /ノート="pc l u s 6-1 SMNペプチド、表V I 参照"
- (xi) 配列の記載: 配列番号30:

Ala Val Ala Glu Gly Thr Asp Arg Val Ile Glu Val Val Gln Gly Ala
 1 5 10 15
 Tyr Arg Ala Ile Arg His Ile Pro Arg Arg Ile Arg Gln Gly Leu Glu
 20 25 30
 Arg Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys Asn
 35 40 45

(2) 配列番号31のための情報:

- (i) 配列特性:
 - (A) 長さ: 42アミノ酸
 - (B) 型: アミノ酸
 - (D) トポロジー: リニア
- (ii) 分子の型: ペプチド
- (v) 断片の型: インターナル
- (ix) 指標:
 - (A) 名称/標識配列: ペプチド
 - (B) 位置: 1 42
 - (D) その他の情報: /ラベル=ペプチド
 /ノート="p c l u s 6. 1-18MNペプチド、表VI参照"
- (xi) 配列の記載: 配列番号31:

Asp Arg Val Ile Glu Val Val Gln Gly Ala Tyr Arg Ala Ile Arg His
 1 5 10 15
 Ile Pro Arg Arg Ile Arg Gln Gly Leu Glu Arg Arg Ile His Ile Gly
 20 25 30
 Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys Asn
 35 40

(2) 配列番号32のための情報:

- (i) 配列特性:
 - (A) 長さ: 30アミノ酸
 - (B) 型: アミノ酸
 - (D) トポロジー: リニア
- (ii) 分子の型: ペプチド
- (v) 断片の型: インターナル
- (ix) 指標:
 - (A) 名称/標識配列: ペプチド
 - (B) 位置: 1 30
 - (D) その他の情報: /ラベル=ペプチド
 /ノート="p 5 3-18MNペプチド、表VI参照"
- (xi) 配列の記載: 配列番号32:

Asp Arg Val Ile Glu Val Val Gln Gly Ala Tyr Arg Ala Ile Arg Arg
 1 5 10 15

Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys Asn
 20 25 30

(2) 配列番号33のための情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ: 31 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: リニア

(ii) 分子の型: ペプチド

(v) 断片の型: インターナル

(ix) 指標:

(A) 名称/標識配列: ペプチド

(B) 位置: 1 31

(D) その他の情報: /ラベル=ペプチド

/ノート= "p 55-18MNペプチド、表VI参照"

(xi) 配列の記載: 配列番号33:

Ala Gln Gly Ala Tyr Arg Ala Ile Arg His Ile Pro Arg Arg Ile Arg
 1 5 10 15

Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys Asn
 20 25 30

(2) 配列番号34のための情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ: 15 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: リニア

(ii) 分子の型: ペプチド

(v) 断片の型: インターナル

(ix) 指標:

(A) 名称/標識配列: ペプチド

(B) 位置: 1 15

(D) その他の情報: /ラベル=ペプチド

/ノート= "p 18MNペプチド"

(xi) 配列の記載: 配列番号34:

Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys Asn
 1 5 10 15

(2) 配列番号35のための情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ: 66 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: リニア

- (ii) 分子の型：ペプチド
 (v) 断片の型：インターナル
 (ix) 指標：
 (A) 名称/標識配列：ペプチド
 (B) 位置：1 66
 (D) その他の情報：/ラベル=ペプチド
 /ノート="P. falciparum CS抗原からのペプチド"
 (ii) 配列の記載：配列番号35：

```

Pro Ser Asp Lys Lys Ile Glu Gln Tyr Leu Lys Lys Ile Lys Asn Ser
1          5          10          15
Ile Ser Cys Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn
20          25          30
Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Lys Pro Lys Asp Glu
35          40          45
Leu Asp Tyr Glu Asn Asp Ile Glu Lys Lys Ile Cys Lys Met Glu Lys
50          55          60
Cys Ser
65

```

(2) 配列番号36のための情報：

- (i) 配列特性：
 (A) 長さ：42アミノ酸
 (B) 型：アミノ酸
 (D) トポロジー：リニア
 (ii) 分子の型：ペプチド
 (v) 断片の型：インターナル
 (ix) 指標：
 (A) 名称/標識配列：ペプチド
 (B) 位置：1 42
 (D) その他の情報：/ラベル=ペプチド
 /ノート=pcl us 6. 1-18IIIBペプチド
 (ii) 配列の記載：配列番号36：

```

Asp Arg Val Ile Glu Val Val Gln Gly Ala Tyr Arg Ala Ile Arg His
1          5          10          15
Ile Pro Arg Arg Ile Arg Gln Gly Leu Glu Arg Arg Ile Gln Arg Gly
20          25          30
Pro Gly Arg Ala Phe Val Thr Ile Gly Lys
35          40

```


【図1】

FIG. 1A

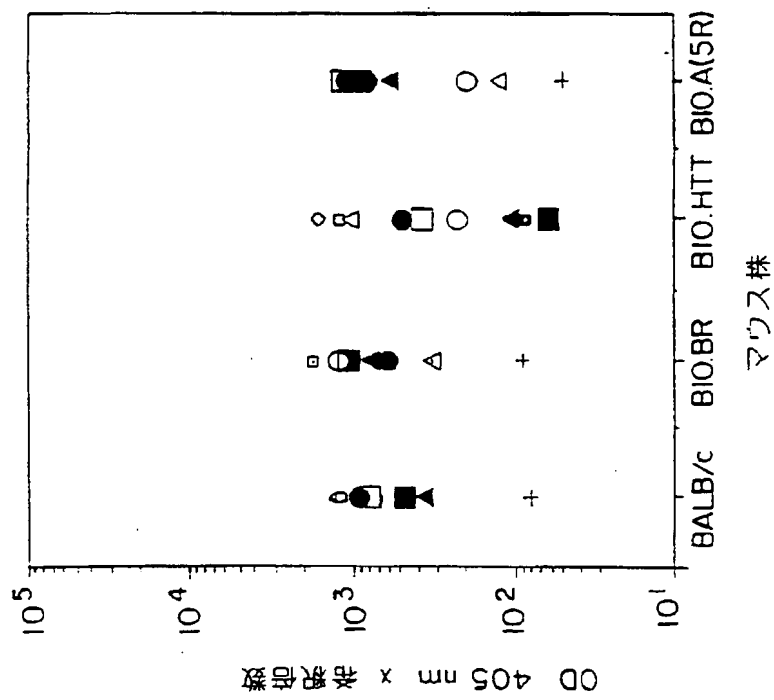
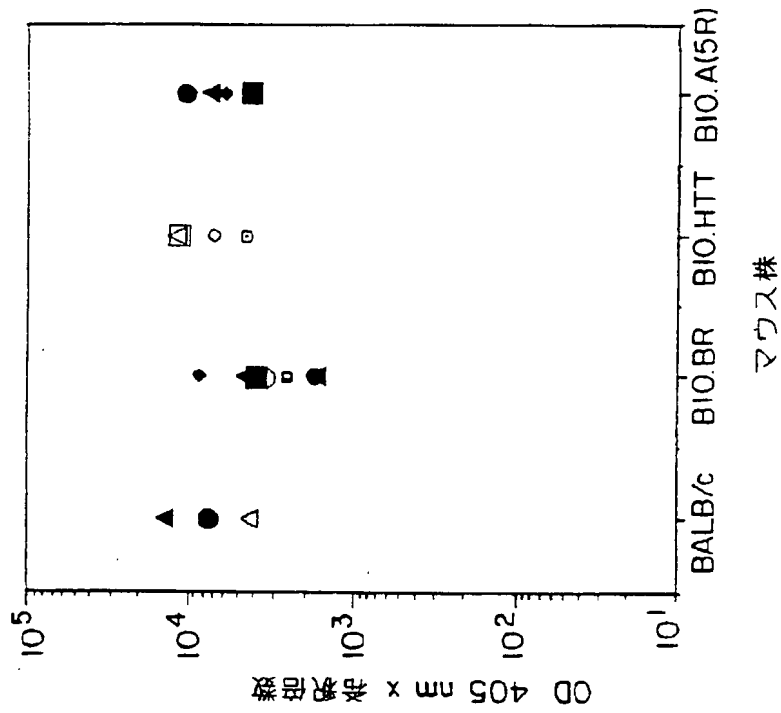


FIG. 1B



【図2】

FIG. 2A

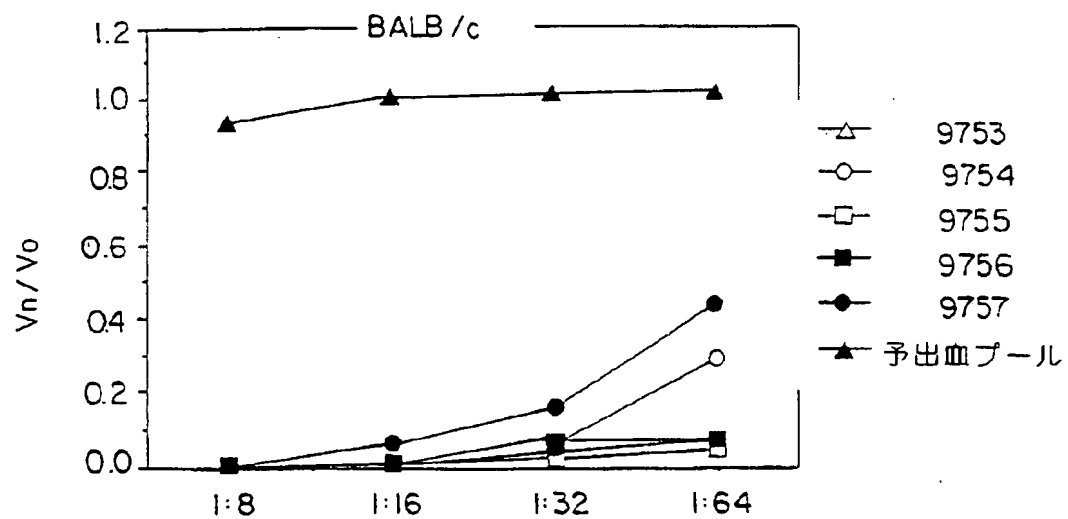
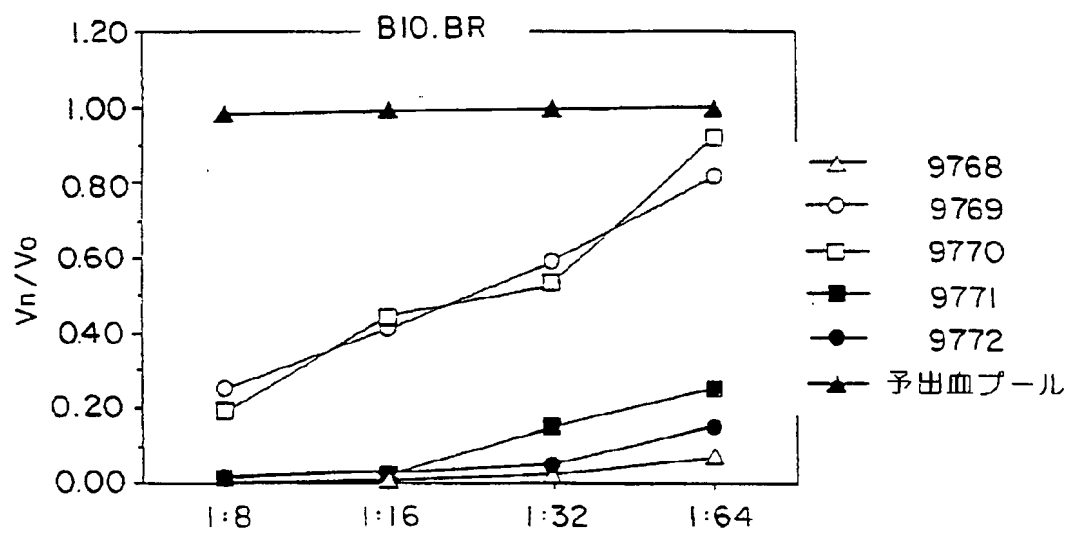


FIG. 2B



【図2】

FIG. 2C

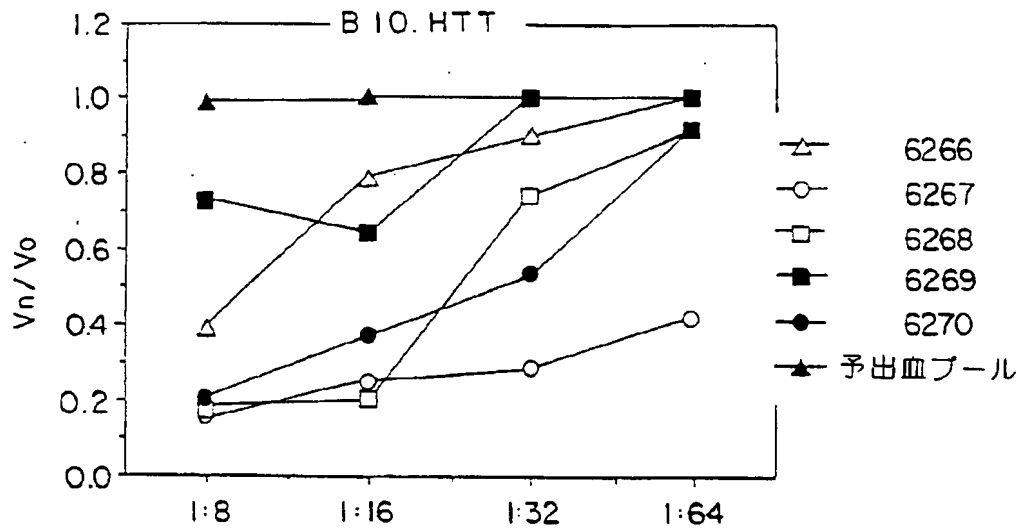
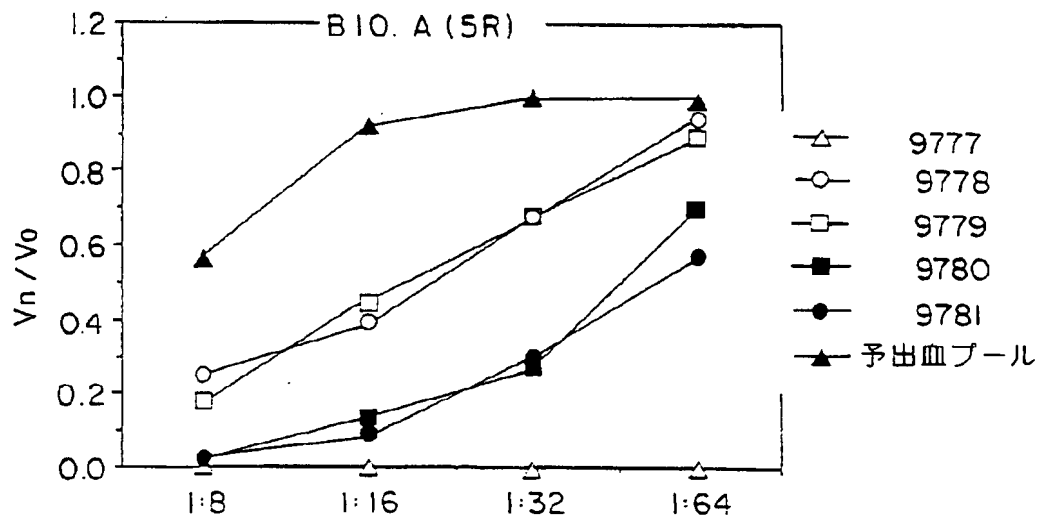


FIG. 2D



【図2】

FIG. 2E

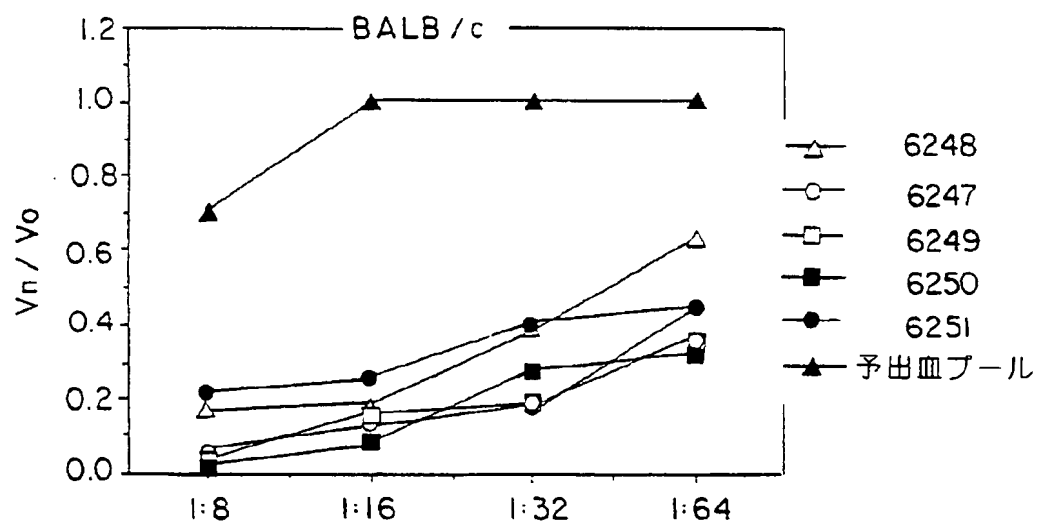
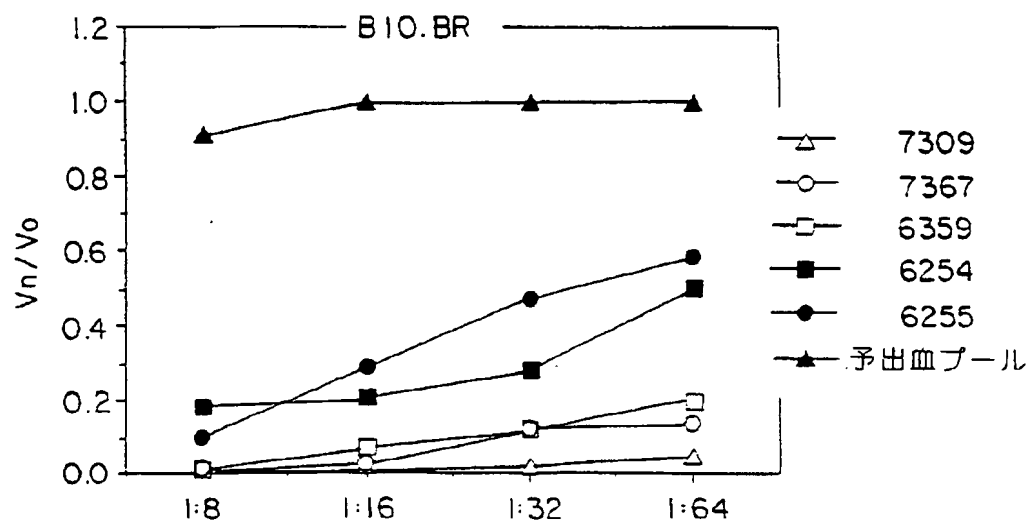


FIG. 2F



【図2】

FIG.2G

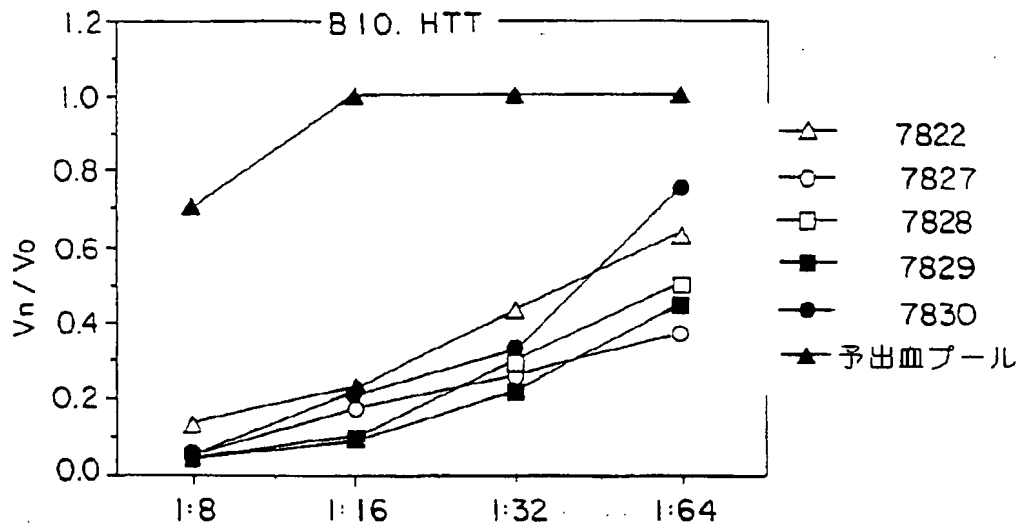
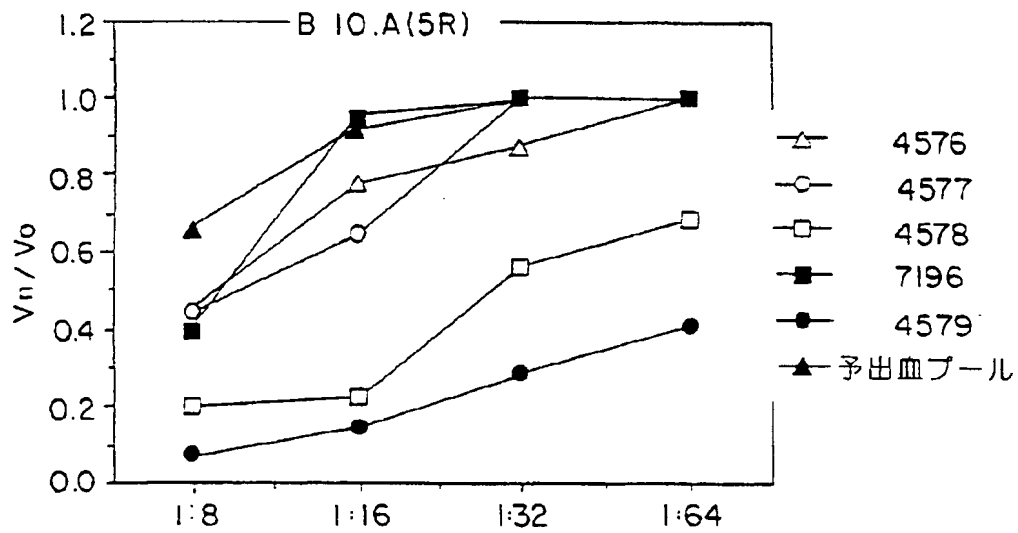


FIG.2H



【図3】

FIG.3A

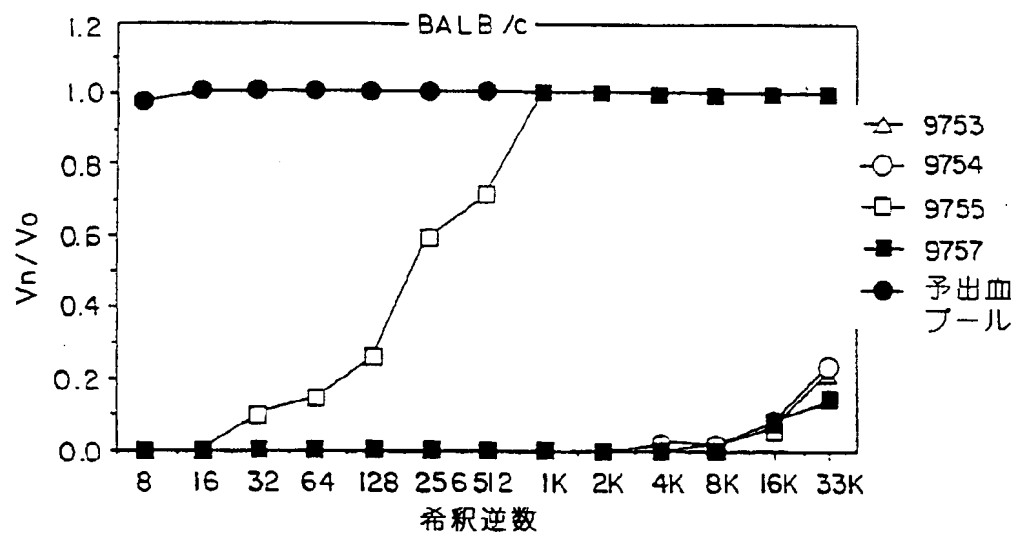
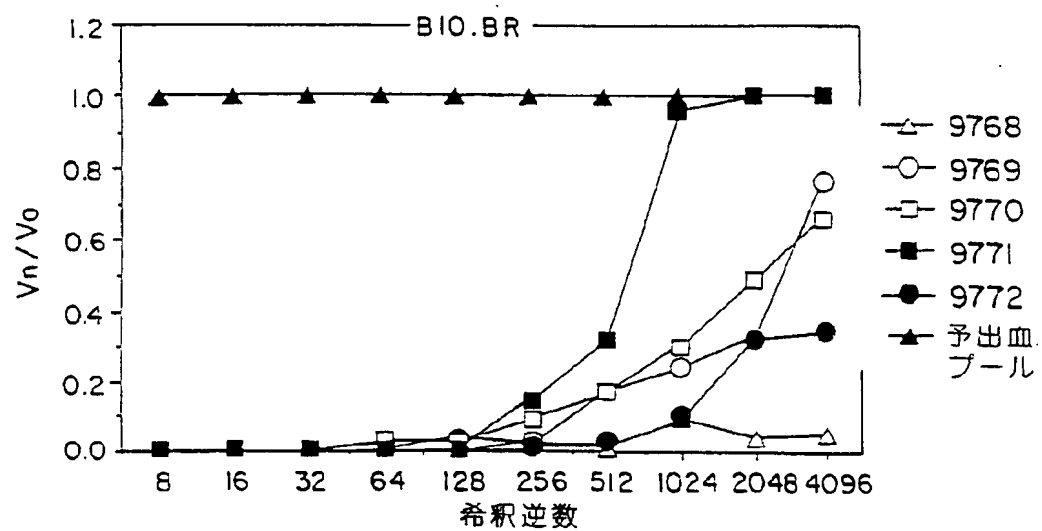


FIG.3B



【図3】

FIG. 3C

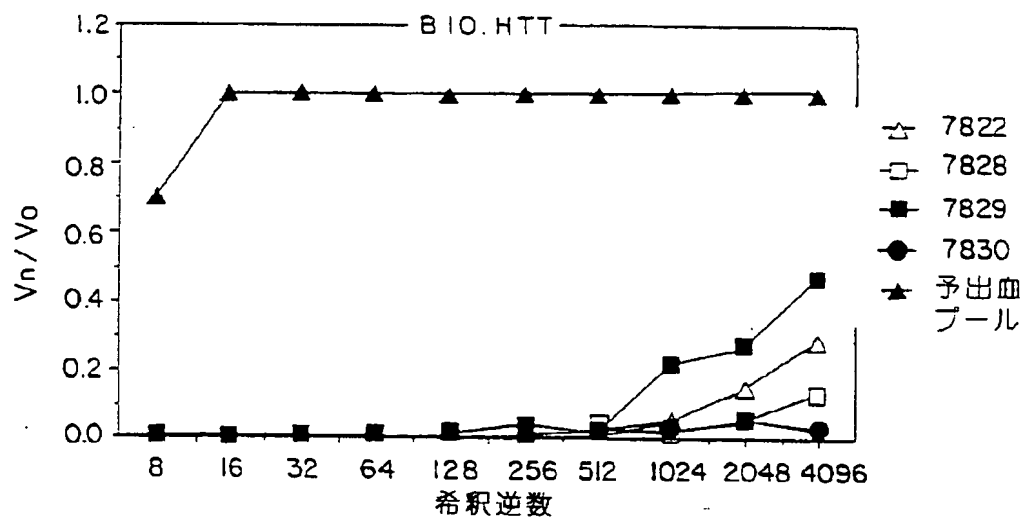
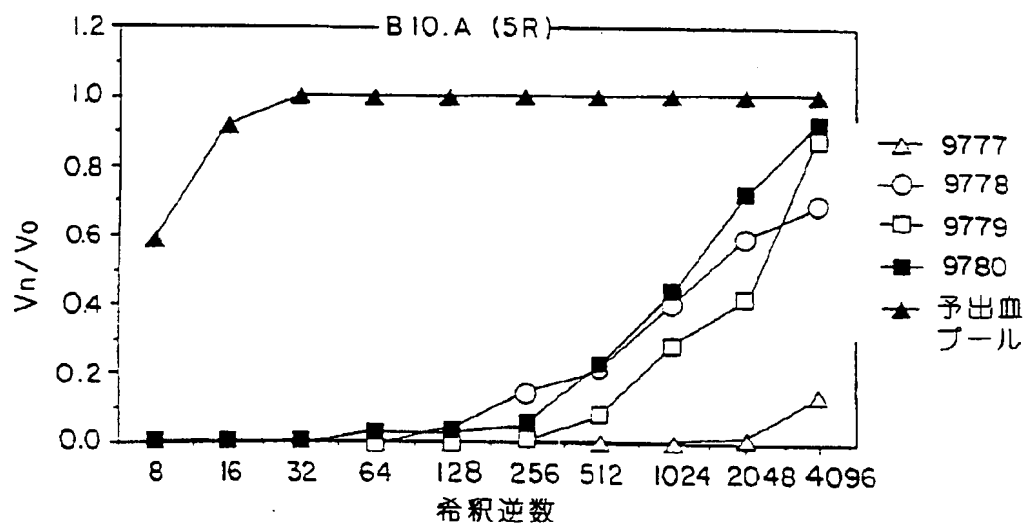


FIG. 3D



【图4】

FIG. 4A

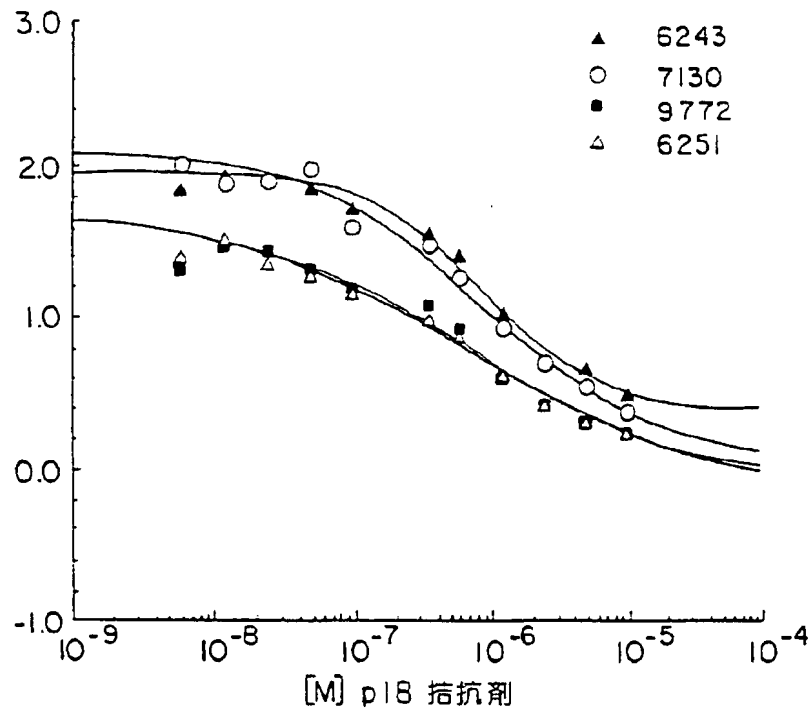
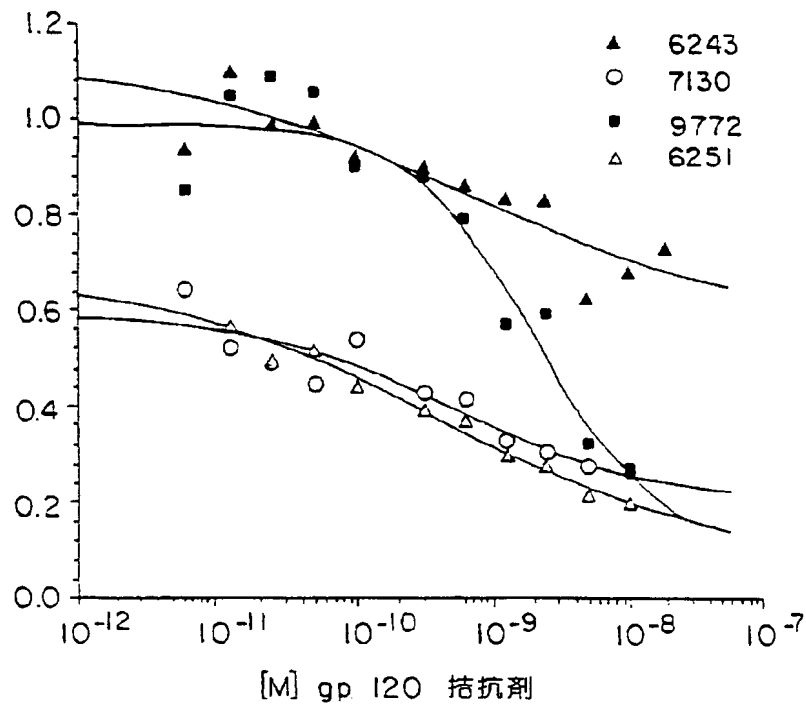


FIG. 4B



【図5】

FIG. 5A

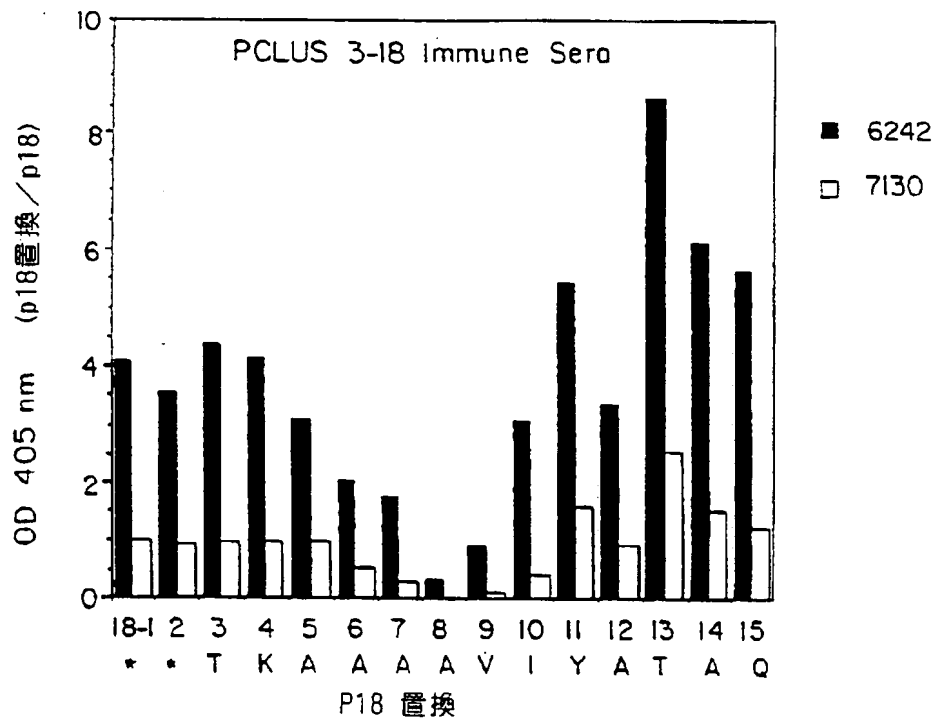
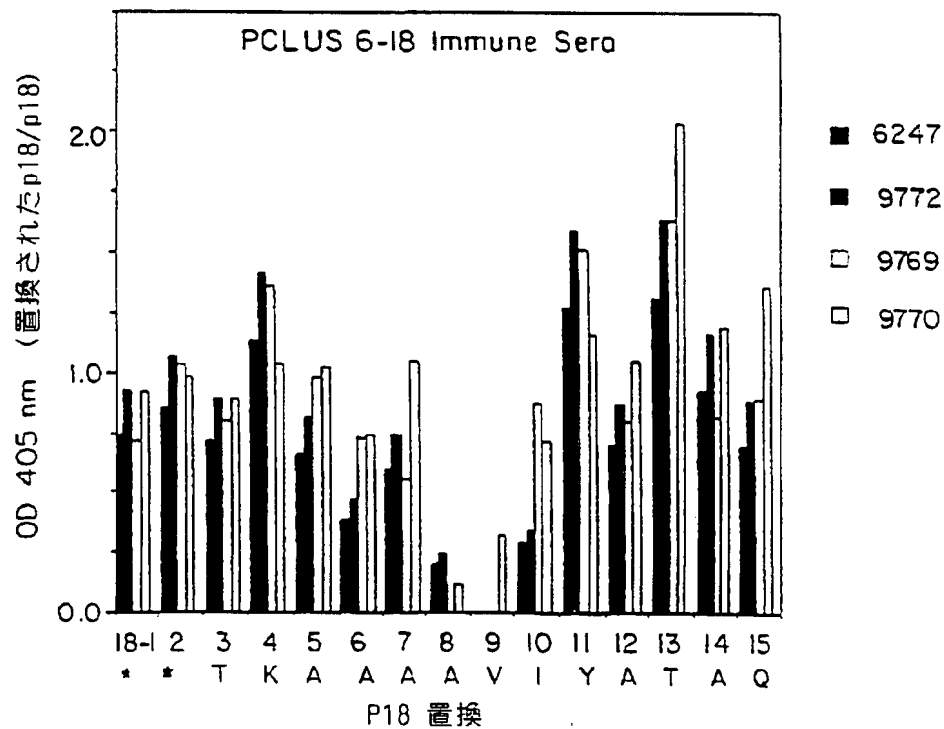


FIG. 5B



【図6】

FIG. 6A

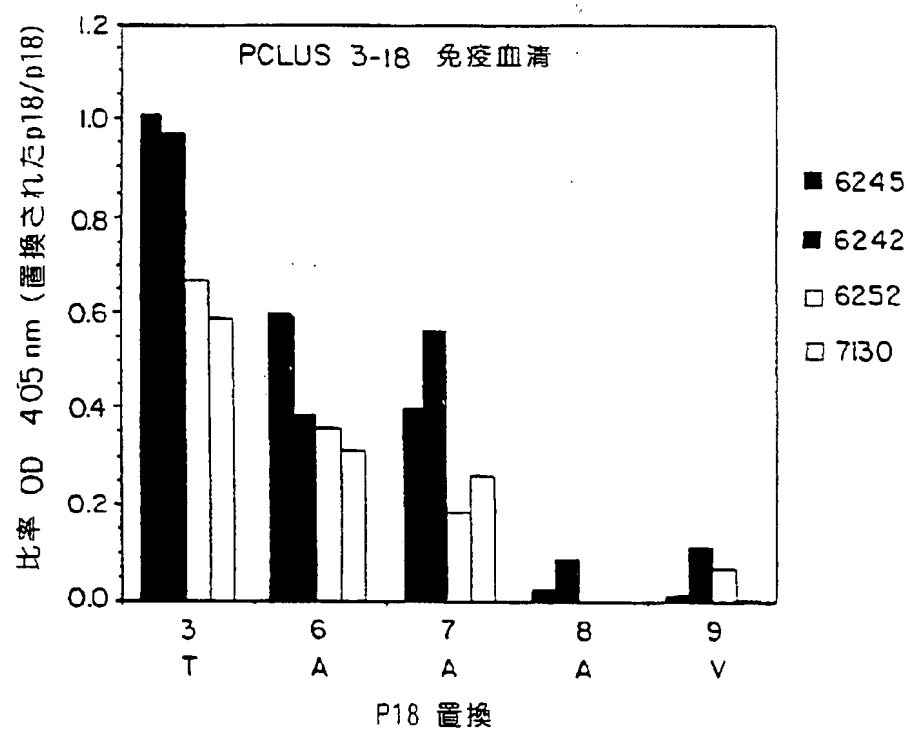
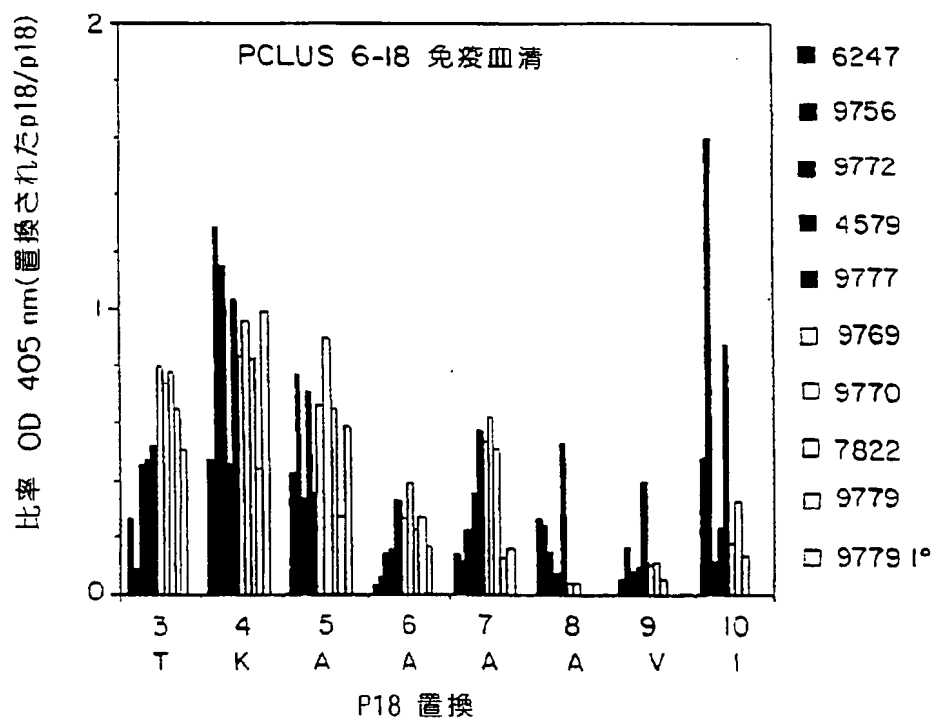


FIG. 6B



【図7】

FIG. 7A

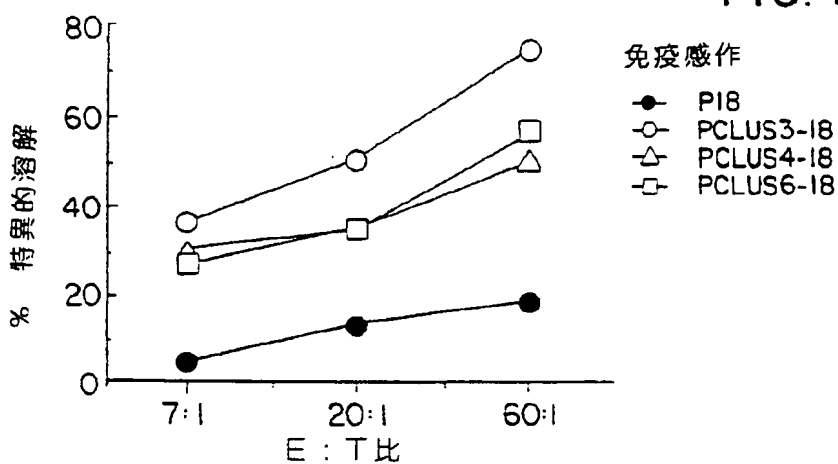


FIG. 7B

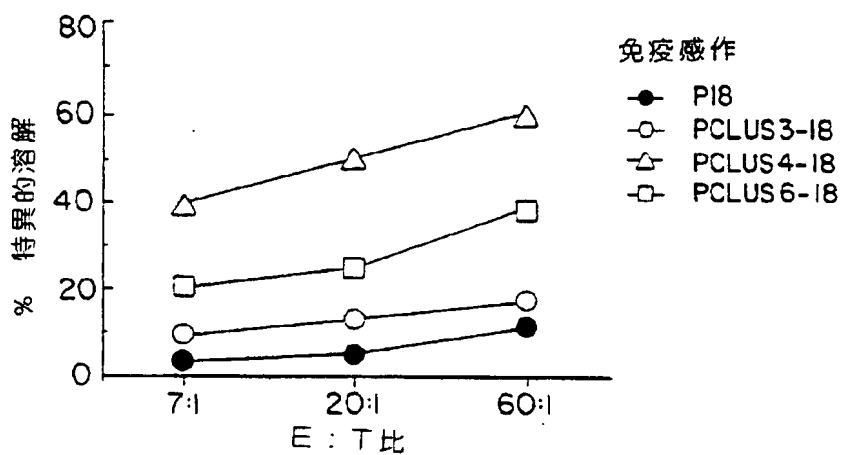
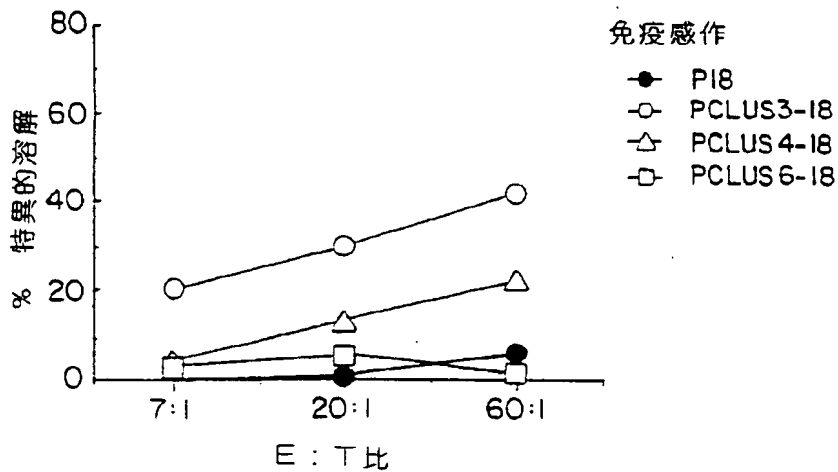


FIG. 7C



【图8】

FIG. 8B

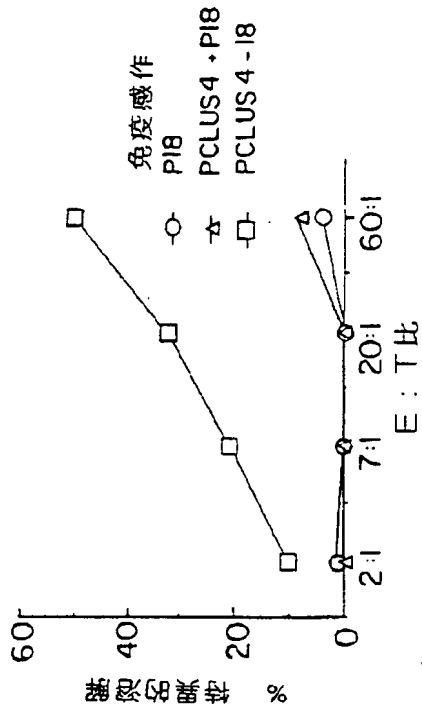


FIG. 8D

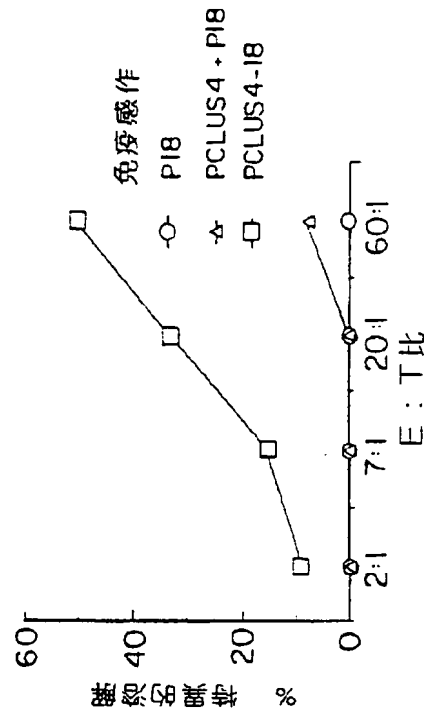


FIG. 8A

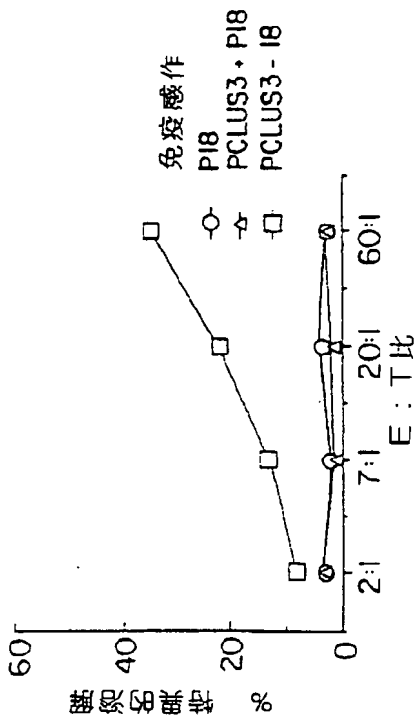
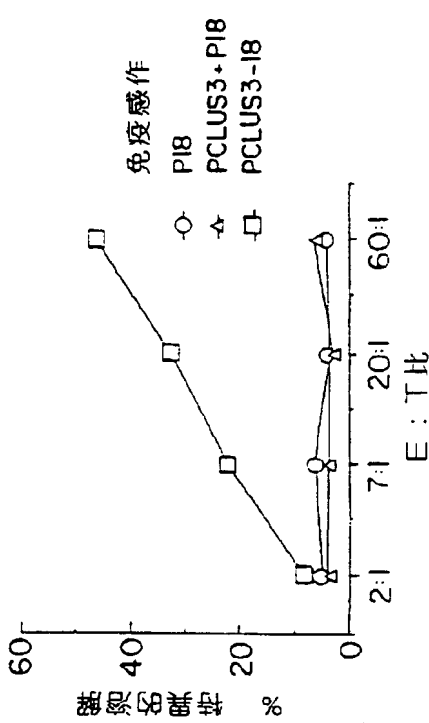


FIG. 8C



【図9】

FIG. 9A

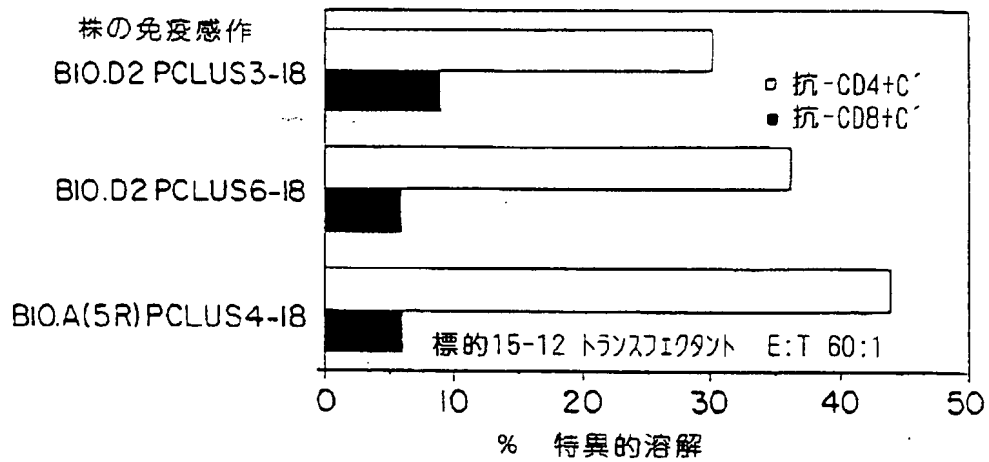
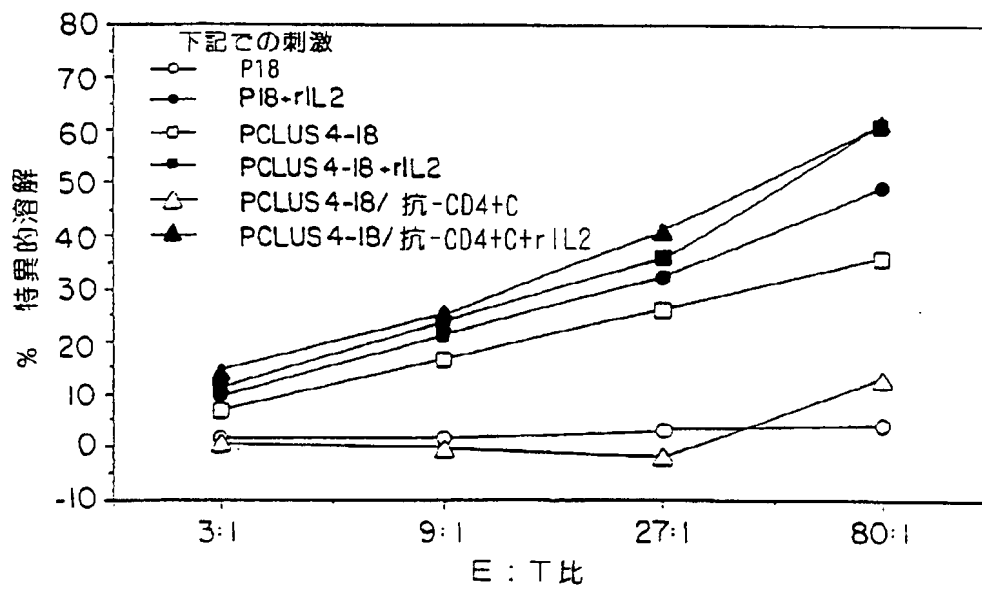


FIG. 9B



【図10】

FIG. 10A

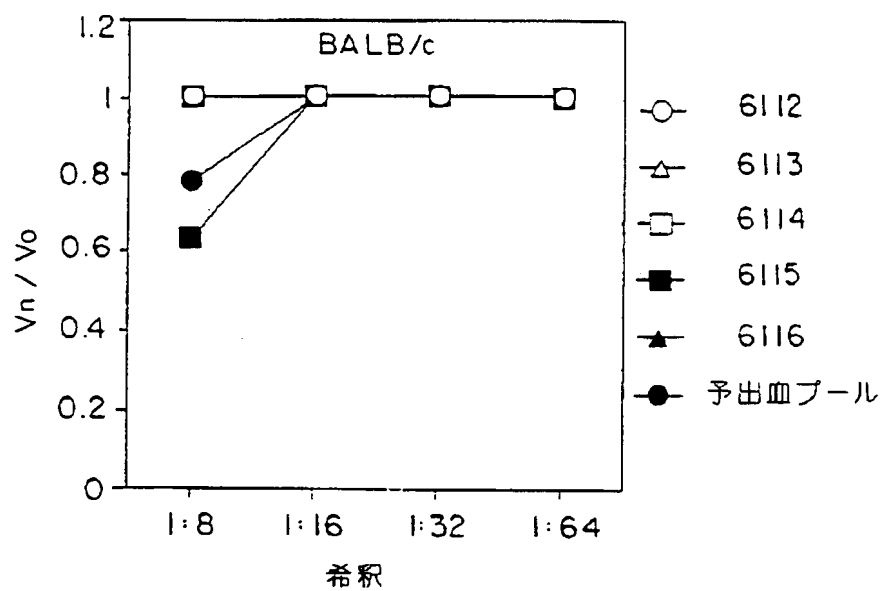
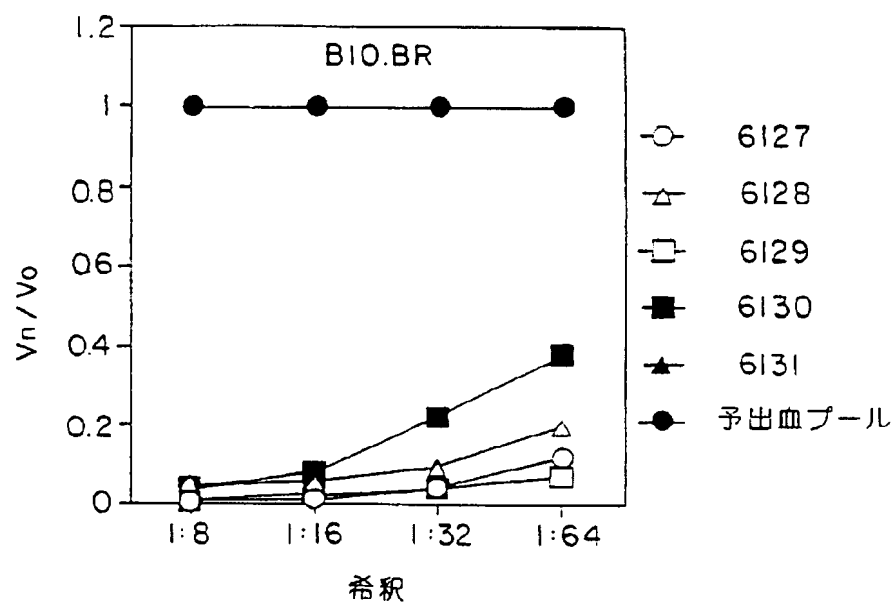


FIG. 10B



【図10】

FIG. IOC

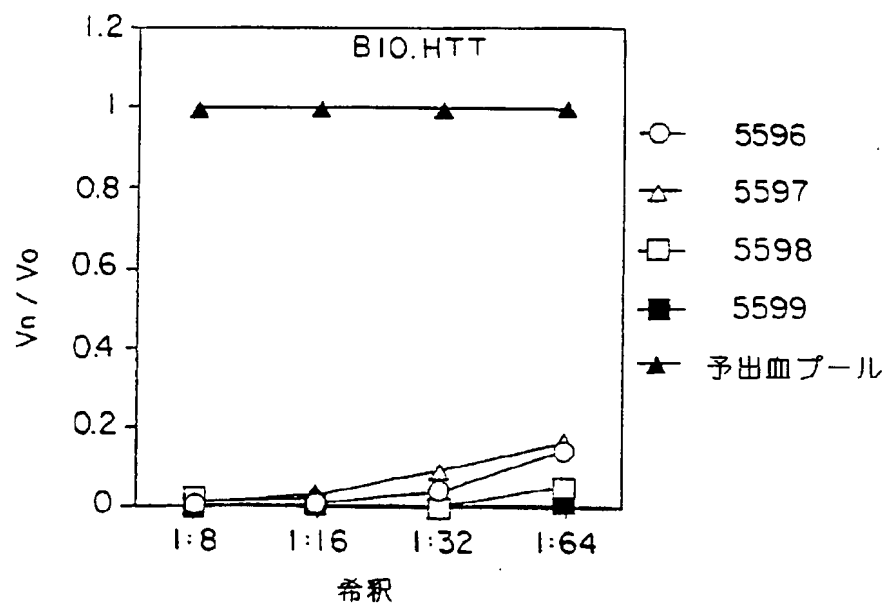
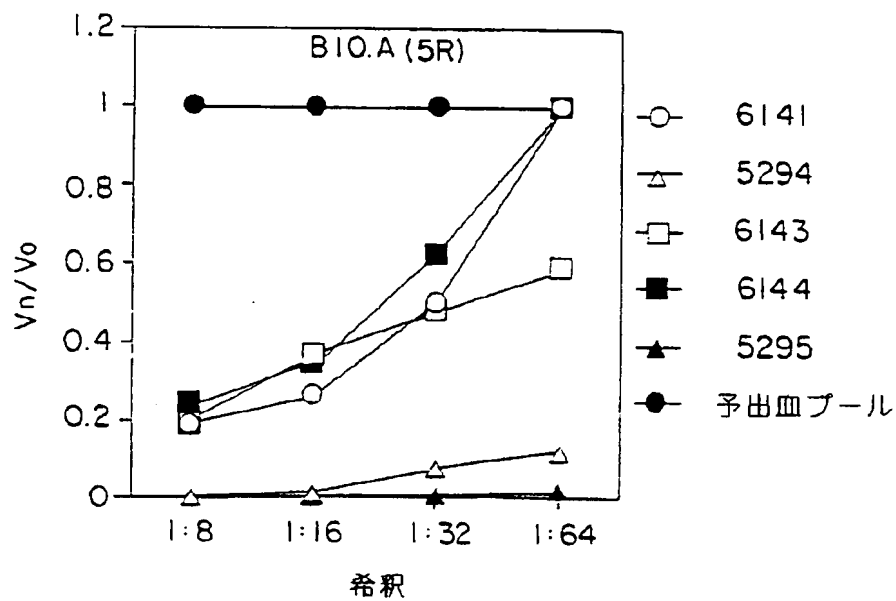


FIG. IOD



【図10】

FIG. 10E

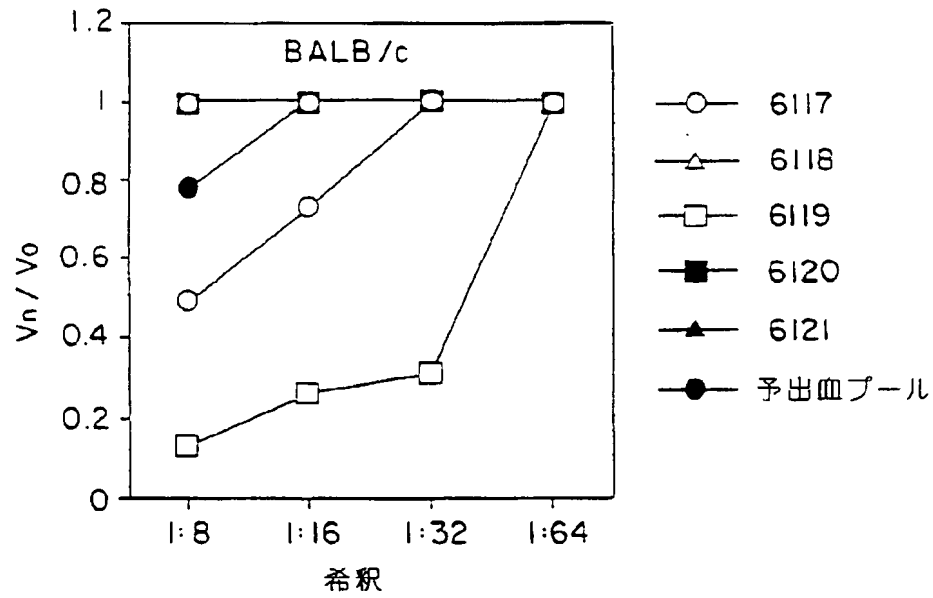
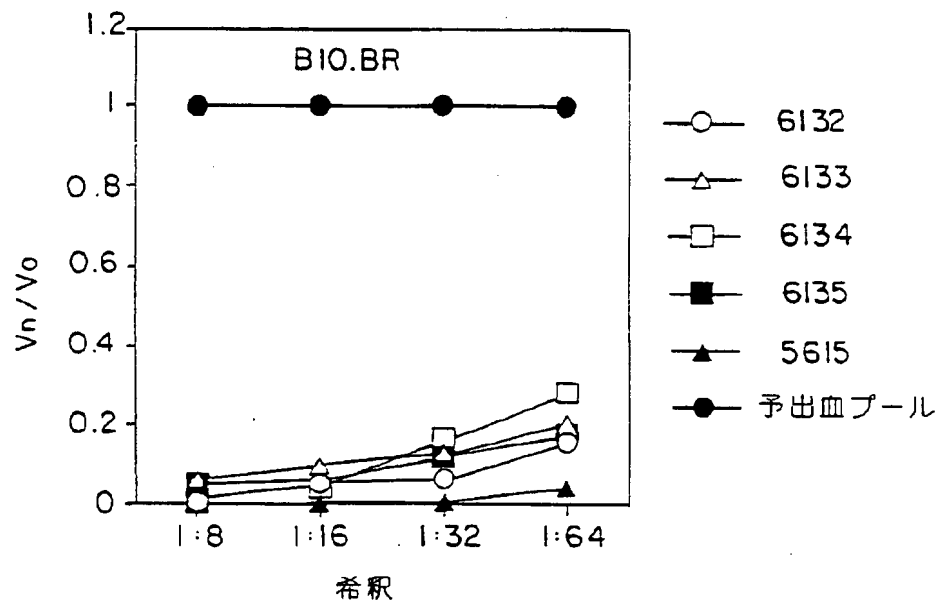


FIG. 10F



【図10】

FIG. 10G

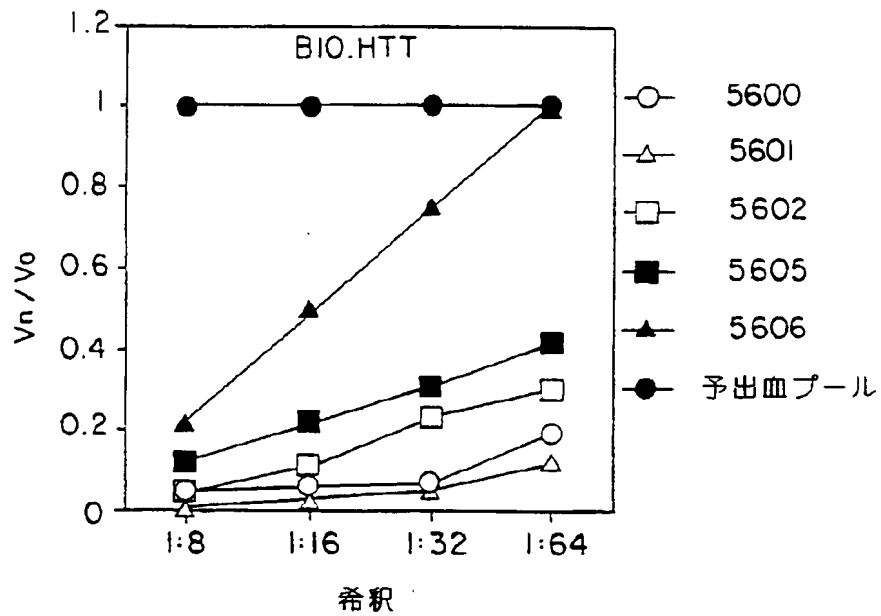
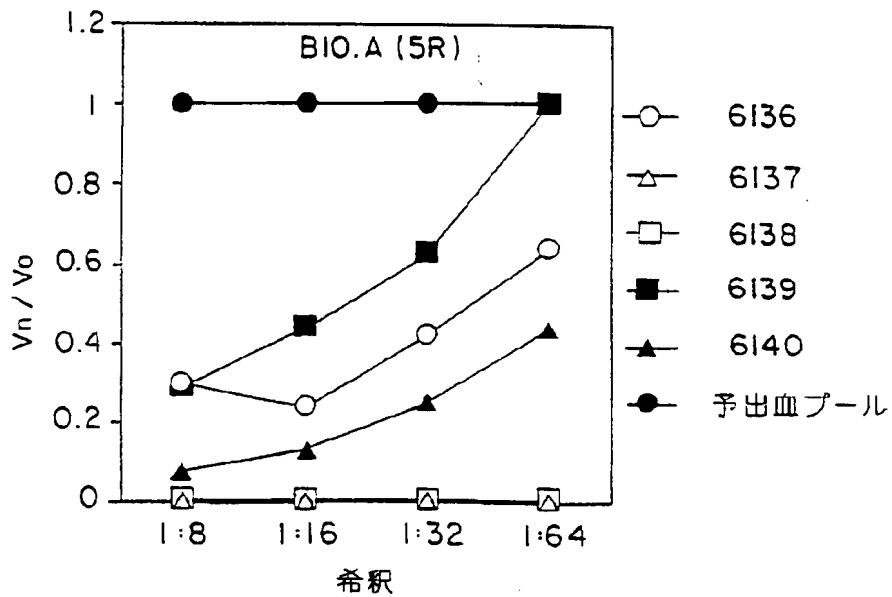


FIG. 10H



【図11】

FIG. 11A

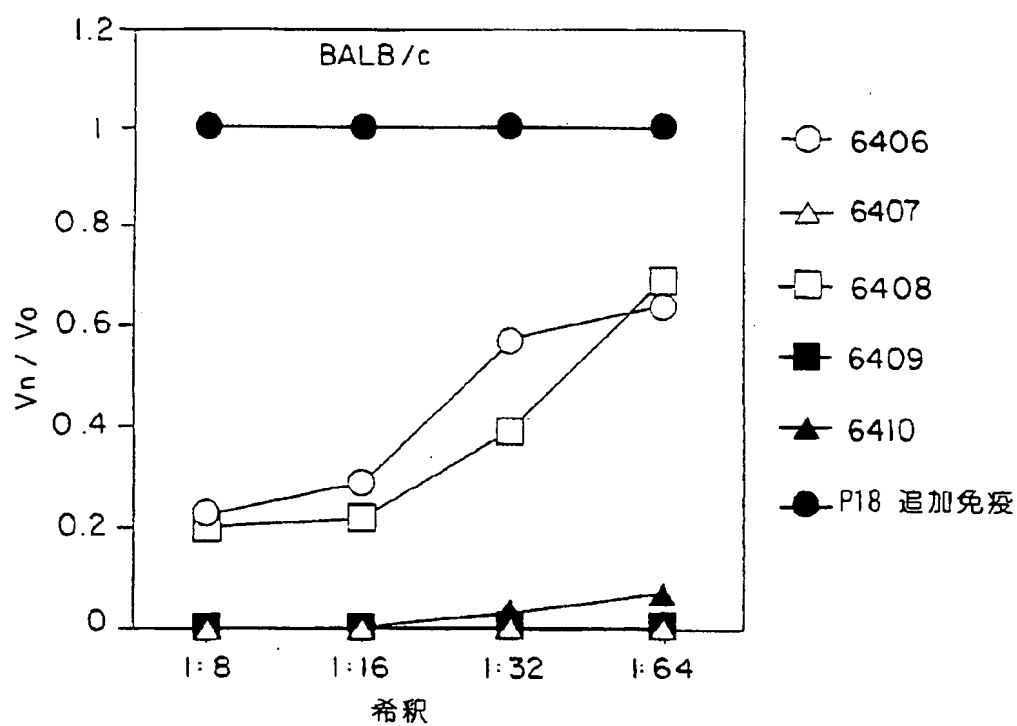
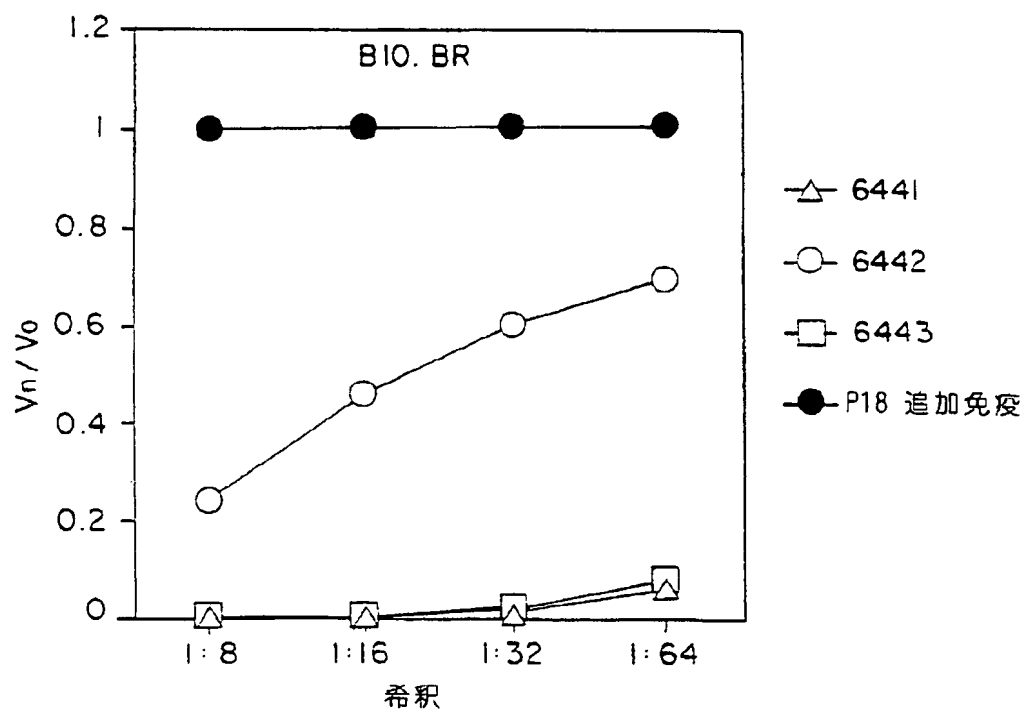


FIG. 11B



【図11】

FIG. IIC

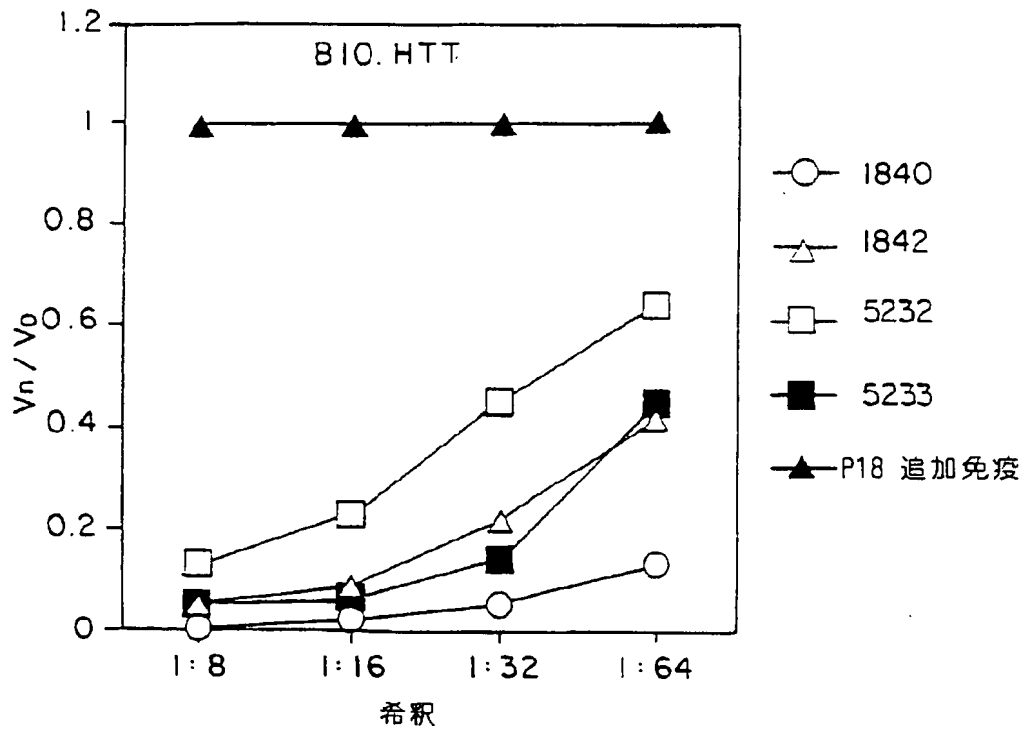
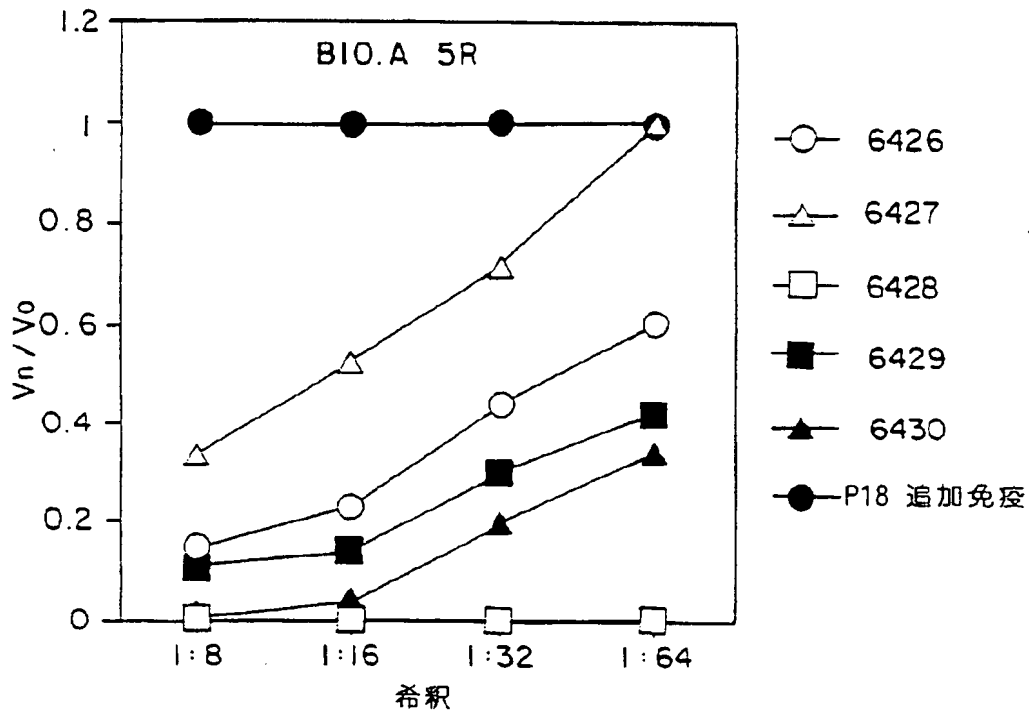


FIG. IID



【図11】

FIG. IIE

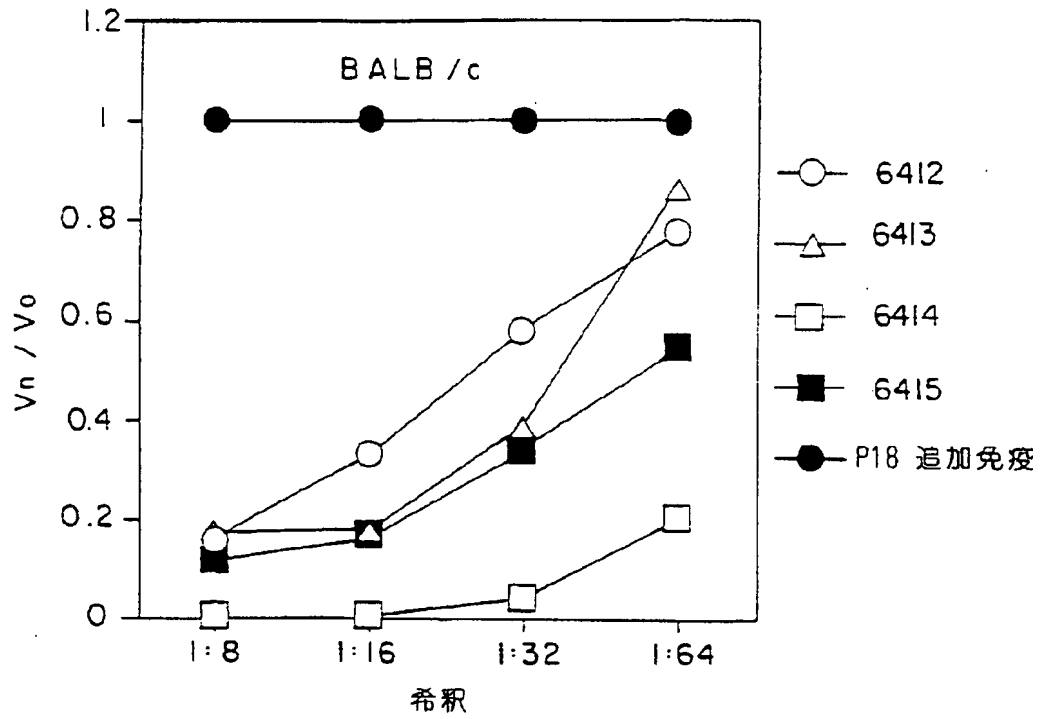
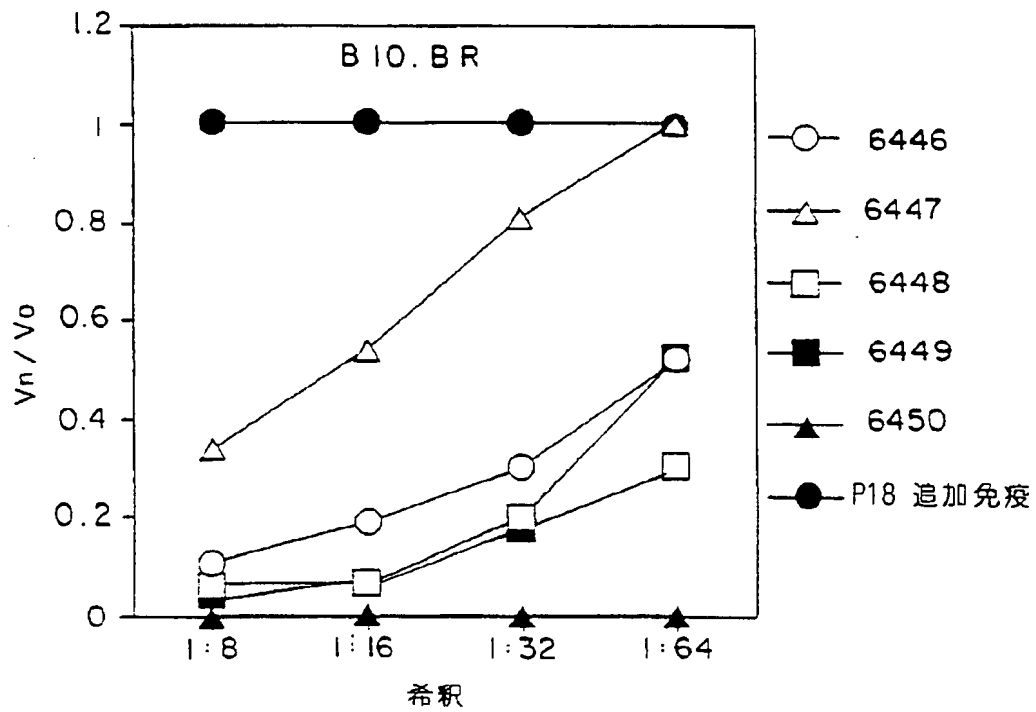


FIG. IIF



【図11】

FIG. IIG

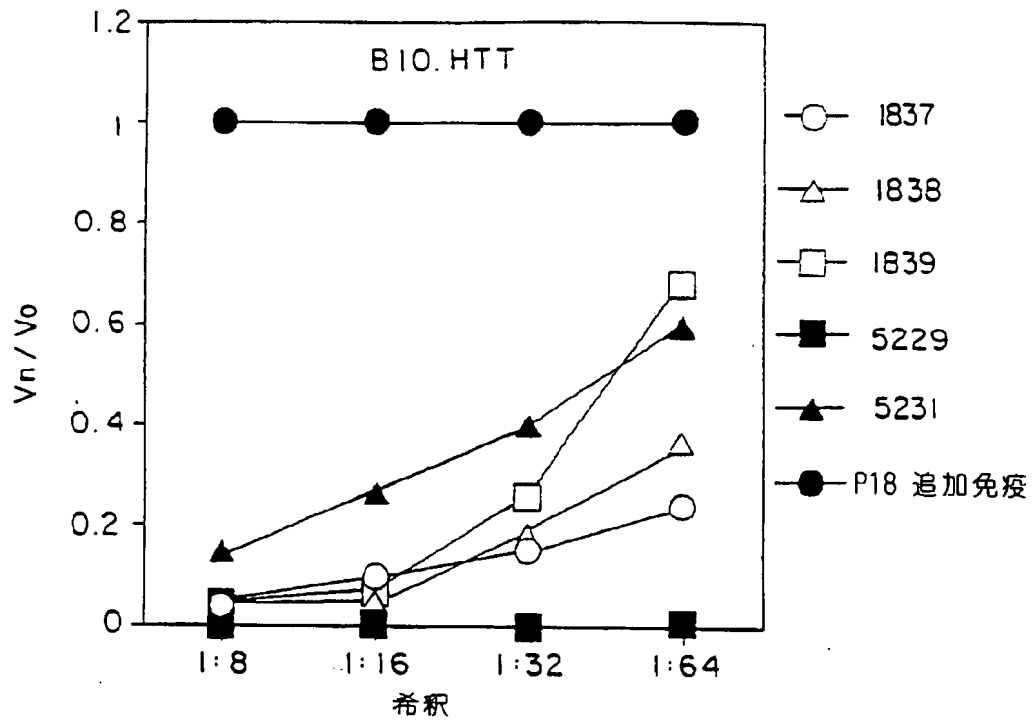
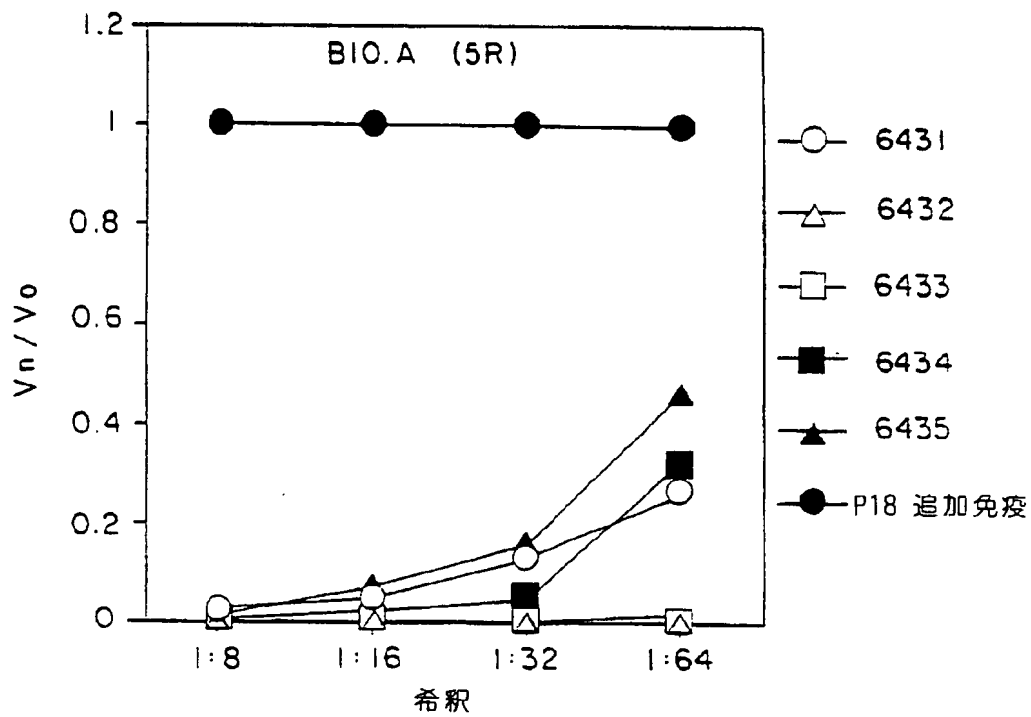


FIG. IIH



【圖12】

FIG. 12A

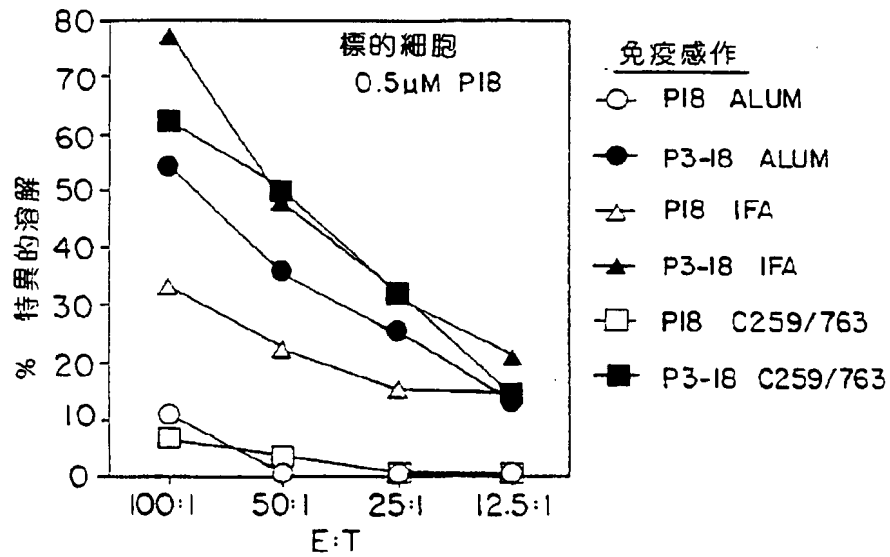
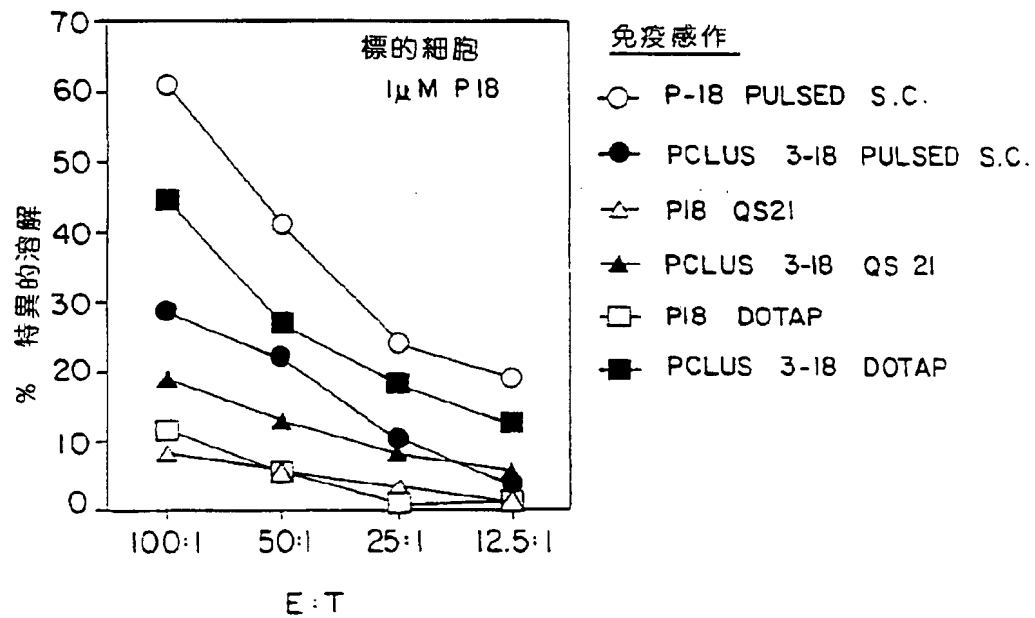


FIG. 12B



【圖 13】

FIG. 13A

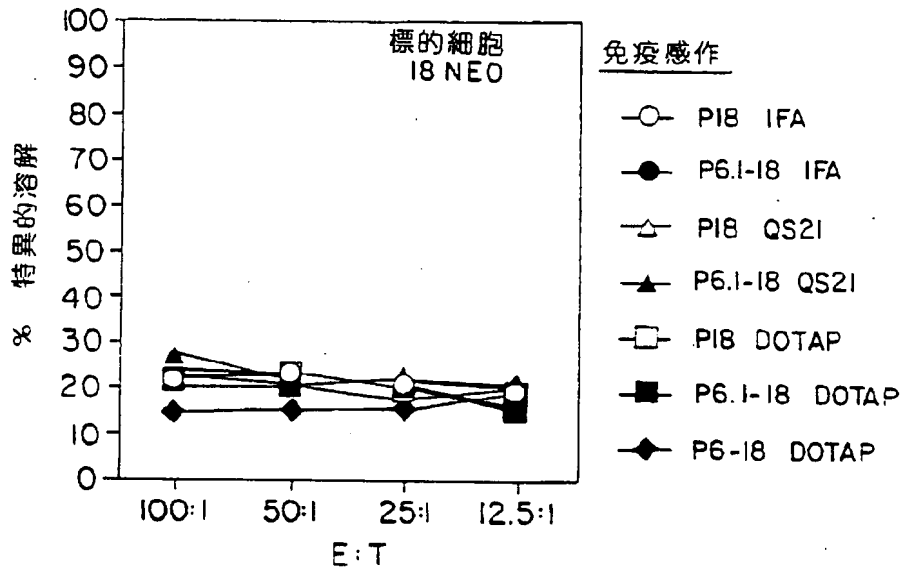
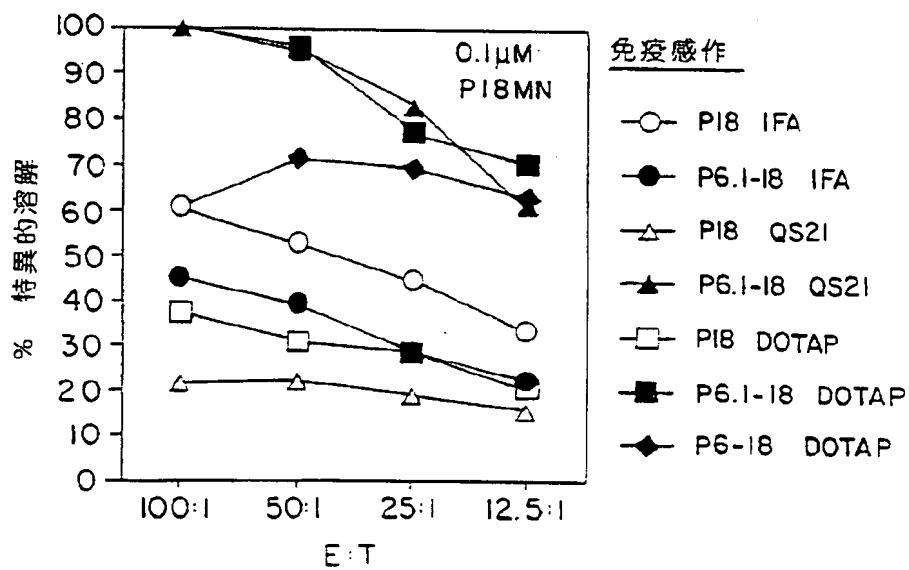


FIG. 13B



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 94/05142

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 5 C07K15/00 A61K39/00 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 C07K A61K C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO,A,93 04697 (THE USA GOVERNMENT) 18 March 1993 see examples 1.2 ---	1-20
Y	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol.86, no.17, September 1989, WASHINGTON US pages 6768 - 6772 K JAWAHERIAN ET AL. 'Principal neutralizing domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein' see discussion, last paragraph --- -/-	1-20

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim on or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 October 1994

Date of mailing of the international search report

27. 10. 94

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2230 JAV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2940, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Masturzo, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Ap. No. No
PCT/US 94/05142

C.(Classification) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JOURNAL OF IMMUNOLOGY., vol.142, no.10, 15 May 1989, BALTIMORE US pages 3612 - 3619 T J PALKER ET AL. 'polyvalent human immunodeficiency virus synthetic immunogen comprised of envelope gp120 T helper cell sites and B cell neutralization epitopes' see the whole document ---	1-20
A	JOURNAL OF IMMUNOLOGY., vol.145, no.8, 15 October 1990, BALTIMORE US pages 2677 - 2685 M K HART ET AL. 'Synthetic peptides containing T and B cell epitopes from human immunodeficiency virus envelope gp120 induce anti-HIV proliferative responses and high titers of neutralizing antibodies in rhesus monkeys' see the whole document ---	1-20
P.X	JOURNAL OF IMMUNOLOGY., vol.150, no.12, 15 June 1993, BALTIMORE US pages 5647 - 5665 J D AHLERS ET AL. 'Construction of an HIV-1 peptide vaccine containing a multideterminant helper peptide linked to a V3 loop peptide 18 inducing strong neutralizing antibody responses in mice of multiple MHCX haplotypes after two immunizations' see the whole document -----	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internatio. application No.

PCT/US 94/05142

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Remark : Although claims 16-18 are directed to a method of treatment of the human body the search has been carried out and based on the alleged effects of the compounds.
2. ☒ Claims Nos.: 1-13, 16, 17, 19-20 (par)
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
The compounds of claim 1 and following are defined only by functional parameters which the Search Division cannot assess. Therefore the search has been limited also for economical reasons to the compounds of claim 1 as further defined by claim 14.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
 2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
 3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 94/05142

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9304697	18-03-93	AU-A- 2569392	05-04-93
		CA-A- 2114849	18-03-93
		EP-A- 0601108	15-06-94
<hr/>			

フロントページの続き

- (72)発明者 アーラース、ジェフリー・デー
アメリカ合衆国、メリーランド州 20895、
ケンジントン、ブライヤース・ミル・ロー
ド 3320
- (72)発明者 ベンドルトン、シー・デイビッド
アメリカ合衆国、メリーランド州 20814、
ベセスダ、ナンバー417、バッテリー・レ
ーン 4998
- (72)発明者 ネイラ、ピーター
アメリカ合衆国、メリーランド州 21702、
フレデリック、サンセット・ドライブ
6516
- (72)発明者 シライ、ムツノリ
香川県木田郡三木町池戸1239-2 医大池
戸宿舎エー202